

PCT/JP03/14321

02.12.03

日 本 国 特 許 庁

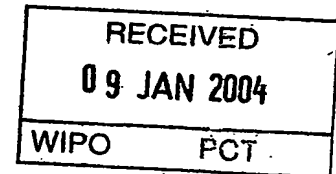
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年11月 7日

出 願 番 号
Application Number: PCT/J P 0 2 / 1 1 5 9 8

出 願 人
Applicant (s): 財団法人くまもとテクノ産業財団
阪口 薫雄

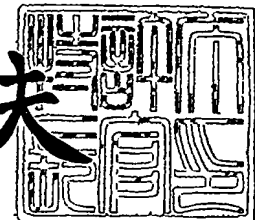


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003 年 12 月 18 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証平 15-500383

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2002年11月07日 (07.11.2002) 木曜日 11時34分49秒

A21666A

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号。	PCT/JP 02/11598
0-2	国際出願日	07.11.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A21666A
I	発明の名称	G A N P 導入トランスジェニック哺乳動物及びその利用
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	財団法人くまもとテクノ産業財団
II-4en	Name	KUMAMOTO TECHNOLOGY & INDUSTRY FOUNDATION
II-5ja	あて名:	861-2202 日本国 熊本県 上益城郡
II-5en	Address:	益城町大字田原 2 0 8 1 番地 1 0 2081-10, Oaza Tabaru, Mashiki-machi Kamimashiki-gun, Kumamoto 861-2202 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4ja	氏名(姓名)	阪口 薫雄
III-1-4en	Name (LAST, First)	SAKAGUCHI, Nobuo
III-1-5ja	あて名:	860-0085 日本国 熊本県 熊本市
III-1-5en	Address:	高平 1 - 3 0 - 6 9 1-30-69, Takahira Kumamoto-shi, Kumamoto 860-0085 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

2/4

原本（出願用） - 印刷日時 2002年11月07日（07.11.2002）木曜日 11時34分49秒

A21666A

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	名称 Name あて名:	特許業務法人特許事務所サイクス SIKs & Co. 104-0031 日本国 東京都 中央区 京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-2en	Address:	03-3538-5680 03-3538-5686
IV-1-3	電話番号	
IV-1-4	ファクシミリ番号	
V	国の指定	
V-1,	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締約国になった国)	SC
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI	優先権主張	なし (NONE)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2002年11月07日 (07.11.2002) 木曜日 11時34分49秒

A21666A

VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	4	-
IX-2	明細書(配列表を除く)	36	-
IX-3	請求の範囲	1	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	19	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数(明細書の配列表を除く)	61	
IX-6	明細書の配列表	2	-
IX-7	合計	63	
IX-8	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本		-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表:		
IX-16(i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し(国際出願の一部を構成しない)	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振込みを証明する書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印		
X-1-1	名称	特許業務法人特許事務所サイクス	



受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	07.11.02
------	------------------------	----------

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年11月07日（07.11.2002）木曜日 11時34分49秒

A21666A

10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明細書

G A N P 導入トランスジェニック哺乳動物及びその利用

技術分野

本発明は、G A N P 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物及びその利用に関する。より詳細には、本発明は、G A N P を高発現し、高親和性抗体を産生することができるトランスジェニック哺乳動物、該トランスジェニック哺乳動物を用いて高親和性抗体を産生する方法、並びに得られた高親和性抗体の利用に関する。

背景技術

免疫系の機能は、T細胞の効果を主とする細胞性免疫反応と抗体の効果を主とする液性免疫とに分類される。実際は、この両者の機能は協調して免疫応答が行われる。抗体は骨髄で生まれるB細胞の細胞表面レセプターとして表現している。生体で形成される最初の抗体の認識する多様性は $10^9 \sim 10^{11}$ のオーダーに上ると言われ、環境に存在しうるあらゆる抗原決定基を認識する。しかしながら、この多様な抗原レセプターは抗原に対して結合する能力は概して低く、低親和性の抗体が産生されることが多いが、これでは十分な免疫応答とはならない。

リンパ球、特にB細胞／免疫グロブリン（抗体）による免疫反応は病原体等の抗原検出のためのキット、診断薬、治療薬において利用されている。このような抗原検出薬、あるいは各種疾患治療薬における抗体としては、抗原に対する反応性が高い抗体（以下「高親和性抗体」という。）を使用すると、抗原に対する感度が優れ、かつ同一投与量での治療薬としての性能が優れる。しかしながら、これまでの所、抗体の親和性を高める手段は知られていない。

生体は病原体や異物が体内に侵入すると、それらを抗原として認識して、末梢のリンパ組織において、抗体遺伝子の抗原と直接結合するV領域の遺伝子に高頻度の体細胞突然変異を誘導する。その変化にはT細胞の刺激を必要としていて、

胚中心領域で活性化T細胞から刺激を受けると考えられる。近年、本発明者らはこの領域の活性化B細胞で選択的に発現が上昇する分子GANPを見出している(国際公開WO00/50611号公報)。この分子はDNAヘリカーゼ活性を有するMCM分子と直接結合し、さらにRNAプライマーゼ活性を有することから、DNA複製に関連することが示唆されている。しかしながら、免疫系におけるGANPの機能については解明されていなかった。

発明の開示

本発明の目的は、各種疾患の診断薬及び治療薬として有効な高親和性抗体、当該抗体を産生するためのトランスジェニック哺乳動物、該高親和性抗体又は高親和性抗体産生細胞を用いた薬剤を提供することである。

本発明者らは、先ずGANP遺伝子の欠損マウスをB細胞選択的に欠損するように企図して作成した(実施例1)。その結果、免疫系の細胞の発達、分化、増殖には影響が見られず、また抗体の産生総和には大きな変化は見られなかった。また、ハプテンとして解析がすすんでいるニトロフェニル基(NP基)をトリガンマグロブリンと結合させて(NP-CG)、T細胞性依存性抗原の反応を調べた。C57BL/6マウスのNPに対する反応は単一のV領域で行われることが知られている。それはVH186.2と呼ばれる抗体のIgG重鎖のV領域とラムダ1遺伝子によってのみ形成されることが知られている。このシステムを使えば抗体がIgG1でVH186.2を見ることによって高親和性抗体のB細胞の遺伝子変異を調べることが可能である。しかも最も強い親和性は33番目のアミノ酸であるトリプトファンがロイシンに変異(W33-L)したときに生じることが報告されている。GANP遺伝子欠損マウスでそのことを調べたところ、野生型マウスに比べて高親和性抗体産生がほとんど見られなかった(実施例1)。

このことをさらに検証するために、GANP遺伝子を過剰に発現するマウスを作成した。ヒト免疫グロブリン遺伝子イントロンエンハンサー部分を5'側に連結してB細胞で選択的に発現させた。このマウスも正常に生まれ、リンパ組織の

発達、分化、増殖には変化が見られない。しかし、NP-CG に対する反応では著しくその高親和性型のV領域遺伝子(W33-L)が増加していた。これらの結果から、GANP分子を高発現させること、およびRNAプライマーゼ活性を賦活化することが免疫応答で高親和性抗体の産生に必要であることを示す(実施例2)。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部が提供される。

好ましくは、導入したGANP遺伝子をB細胞で発現される。

好ましくは、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、GANP遺伝子をトランスフェクションしたES細胞から発生させる。

本発明の別の側面によれば、GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与して抗体を産生する、高親和性抗体の産生方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した高親和性抗体の産生方法により産生される高親和性抗体又はその断片が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した高親和性抗体又はその断片を含有する、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した抗体のV領域を含むヒト型抗体又はその断片が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したヒト型抗体又はその断片を含む薬剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、抗原を投与した上記したトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、免疫組織化学分析を、抗GANPモノクローナル抗体およびALP結合抗ラットIg抗体を用いて自己免疫疾患モデルMRL/lpr、NZB および正常C57BL/6

雌マウス由来の膝窩リンパ節で行った結果を示す。Vector Blue (ALP 基質) で染色された GANP^{hi} 細胞は 7 週目に MRL/lpr マウスのリンパ節で観察されたが、同年齢の NZB マウスでは観察されず、40 週目に出現した。正常 C57BL/6 マウスでは、極少数の GANP^{hi} 細胞が全期間を通じて観察された。スケールバーは 100 μ 。

図 2 は、雌 NZB マウスの膝窩のリンパ節中の GANP^{hi} 細胞の出現速度を示す。NZB マウスのリンパ節中の GANP (上部) および pSer502 GANP (真中) の発現を比較した。pSer502 GANP は抗 pSer502 GANP (PG/103) モノクローナル抗体 (青) で検出し、全切片をビオチン標識抗 B220 モノクローナル抗体で染色した後、HRP 結合ストレプトアビジンと DAB (茶色) を組み合わせて検出した。2 回の独立した実験から代表的データを示した。スケールバーは 100 μ m。下段の図は、加齢の間に濾胞外領域の GANP^{hi} (黒の棒) および pSer502 GANP^{hi} (点の棒) の細胞数を示す。

図 3 は、雌 NZB マウスの脾臓中の GANP^{hi} 細胞の出現速度を示す。染色は図 2 と同様に行った。3 回の独立した実験からの代表的データを示した。スケールバーは 100 μ m。

図 4 は、複数系統のマウス由来の脾臓切片を抗 GANP モノクローナル抗体で染色した結果を示す。GANP^{hi} 細胞は MRL/lpr、NZB、B/WF1、BXSB の赤脾髄で顕著に出現したが、NOD 又は BALB/c マウスの脾臓には出現しなかった。RP; 赤脾髄、F; 濾胞、スケールバーは 100 μ m。

図 5 は、脾臓の赤脾髄における GANP^{hi} 細胞の同定を示す。ビオチン標識抗 B220 モノクローナル抗体 (左)、ビオチン標識抗 Syndecan-1 モノクローナル抗体 (真中)、又はビオチン標識抗 IgM モノクローナル抗体 (右) を用いて NZB マウスの脾臓切片について二重染色を行い、GANP^{hi} 細胞を同定した。二重に染色された細胞は矢頭で示し、これは GANP^{hi} 細胞が B220⁺Syndecan⁺IgM⁺ であることを示す。GANP 発現は ALP (青色) で示し、他のマーカーは HRP (茶色) で示す。3 回の独立した実験から代表的データを示した。スケールバーは 50 μ m。

図6は、G A N P^{hi}細胞における形質細胞マーカーの同定を示す。G A N P^{hi}細胞が増殖性形質芽細胞であるかどうかを調べるために、マウスにBrdU (1 mg/マウス)を投与した。2時間後、マウスを殺し、脾臓切片を調製した。切片を抗G A N Pモノクローナル抗体(青)及び抗BrdUモノクローナル抗体(赤)で二重染色した。G Cは胚中心を示す(左)。PAS染色は常法に従って行った。G A N P単一陽性G A N P^{hi}細胞は矢印で示し、PAS単一陽性細胞が矢頭で示した(真中)。切片はビオチン標識抗CD-5モノクローナル抗体で染色した。PALS領域を示した(右)。3回の独立した実験から代表的データを示した。スケールバーは100 μ m。

図7は、TD-Ag免疫によるC57BL/6マウスの脾臓における赤脾髄領域におけるG A N P^{hi}細胞の発現を示す。雌C57BL/6マウス(7週齢)を、TNP-Ficoll (TI-2-Ag)又はTNP-KLH (TD-Ag)で腹腔内免疫し、14日後に脾臓を得た。TNP-Ficollで免疫したマウスは、ビオチン標識抗IgDモノクローナル抗体で対比染色した場合、G A N P^{hi}細胞を赤脾髄領域で示さなかった(左)。TNP-KLHで免疫したマウスは、G A N P^{hi}細胞の誘導を赤脾髄領域で示した(右)。G A N P^{hi}細胞は矢印で示す。WPは白脾髄領域を示す。スケールバーは100 μ m。

図8は、DaudiにマウスG A N Pを安定的に発現させたトランスフェクタントの体細胞突然変異を示す。VH3-CH1Cmuの断片をPCRで増幅してプラスミドにサブクローニングし、シークエンスした。|はサイレントミューテーション(アミノ酸が変わらない)、もう一つの記号はアミノ酸が置換している変異。Daudi/mockではほとんど変異が入っていないが、Daudi/G A N P 14, 15, 17, 21の4クローンは程度の差はあるが変異を多く認める。DNAプライマーゼ活性の制御に関係する502番目のセリンをアラニンに置換した変異体(G A N P S/A)を導入したトランスフェクタントでは変異の入る効率が減少する。

図9は、B細胞でG A N Pを過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製を示す。Igエンハンサー/プロモーター制御下にマウスG A N Pを過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した(図a及び図b)。G A N P mRNAの発現が亢進していることはRT-PCRで確認した(図c)。

図 1 0 は、G A N P 過剰発現トランスジェニック (Tg) マウスに 50 μ g の NP-CG を 2 週間おきに 3 回免疫して、VH186.2 を PCR で増幅し、体細胞突然変異を解析した結果を示す。変異の数は Tg でやや増加しているが、高親和性を示す 33 番目の W が L に変わる変異は Tg で約 3 倍になっていた。

図 1 1 は、B 細胞特異的 G A N P 欠損マウス (B-KO) の作製を示す。エクソン 2 を loxP 配列で挿んだ flox マウスを作製し、これと CD19-Cre マウスと交配させて、B 細胞で G A N P が欠損するマウスを樹立した (図 a 及び図 b)。B 細胞で G A N P の発現が見られないことは、RT-PCR と細胞染色で確認した (図 c 及び図 d)。

図 1 2 は、B 細胞特異的 G A N P 欠損マウス (B-KO) を用いた細胞表面染色の結果を示す。WT (野生型) と B-KO で差はなかった。B-KO のリンパ節で IgM⁺IgD⁺ の集団が減少していた。

図 1 3 は、増殖アッセイの結果を示す。ほとんど差はなかったが、CD40 刺激の増殖のみが半分くらいに減少していた。

図 1 4 から図 1 6 は、B-KO マウスにおける抗原特異的抗体産生を測定した結果を示す。TI 抗原である TNP-Ficoll を免疫して 14 日後の抗 TNP 抗体価を ELISA で測定したが、特に差はなかった。TD 抗原である TNP-KLH では 10 日後ではほとんど差はなかったが、14 日後では B-KO でやや高かった。胚中心 (GC) 形成を調べてみると、免疫後 10 日では B-KO の方が GC 形成がやや悪かった。しかし、14 日後では WT に比べて B-KO の方が数が多くなっており、20 日後でも GC 形成が遷延していた。

図 1 7 及び図 1 8 は、B-KO マウスにおける親和性成熟の障害を示す。100 μ g の NP-CG を免疫し、NP-結合 IgG1 弱陽性 CD38 弱陽性を GC-B 細胞としてソーティングし (図 1 7)、そこからゲノム DNA を抽出し、VH186.2 を PCR で増幅し、シーケンス解析を行った (図 1 8)。その結果、変異の数が減少し、33 番目の W が L に変わる変異は B-KO で 1/3 に低下した。この結果より、G A N P は親和性の成熟に必須であることが示された。

図 1 9 は、G A N P トランスジェニックマウスを用いて高親和性抗体を産生し

た結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

(1) G A N P 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物

本発明は、G A N P 遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物に関するものであり、当該トランスジェニック哺乳動物は好ましくは、導入したG A N P 遺伝子をB細胞で発現することができる。

G A N P 遺伝子とその関連分子で形成される複合体は遺伝子に変異を誘導するプロセスで直接および間接的に必要な分子である。G A N P は、遺伝子変異を修復する際にV領域の高親和性の変異の誘導を促す能力を保有していることから、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、このG A N P 又はその変異遺伝子の導入によって獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、この遺伝子を過剰に発現するトランスジェニック哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い抗体を産生することができるため、このトランスジェニック非ヒト哺乳動物に抗原を免疫することで、従来では得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができ、難治性の病原微生物や異物を排除できるモノクローナル抗体を得ることができる。また、本発明のトランスジェニック哺乳動物を用いてヒト型抗体を作成することによって、抗体療法の効力を飛躍的に高めることが可能である。

本発明におけるG A N P 蛋白質とはW O 0 0 / 5 0 6 1 1 号公報にそのアミノ酸配列が特定されている210kDaの分子量を有する蛋白質である。G A N P 蛋白質はRNAプライマーゼ活性を有し、B細胞の細胞周期調節に関与していることが報告されている。

G A N P 蛋白質及びそれをコードする遺伝子は、国際公開W O 0 0 / 5 0 6 1 1 号公報に記載されており、具体的には国際公開W O 0 0 / 5 0 6 1 1 号公報の配列表の配列番号1または配列番号3に記載のアミノ酸配列により特定されるG

ANP 蛋白質、及びそれをコードする遺伝子が挙げられる。

また GANP 遺伝子は変異体でもよく、具体的には、国際公開 WO 00 / 50 6 1 1 の配列表の配列番号 1 または配列番号 3 に記載のアミノ酸配列において、一若しくは複数のアミノ酸が欠失しており、一若しくは複数のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び／又は一若しくは複数の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記 GANP 蛋白質と同様の RNA プライマーゼ活性を有する GANP 変異蛋白質を使用することもできる。そのような変異遺伝子の詳細並びに取得方法は国際公開 WO 00 / 50 6 1 1 号公報に記載されている。

本発明における「哺乳動物」とは、ウシ、ブダ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター及びモルモット等の任意の哺乳動物を意味し、好ましくはマウス、ウサギ、ラットまたはハムスターであり、特に好ましくはマウスである。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に 8 細胞期以前）において、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより導入遺伝子である GANP 遺伝子を導入することにより作製することができる。また、該遺伝子導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする GANP 遺伝子を転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞配合法により融合させることによりトランスジェニック動物を作製することもできる。

GANP 遺伝子を対象動物に導入させる際、当該遺伝子を対象となる動物の細胞で発現させうるプロモーターの下流に連結した遺伝子構築物として導入することが好ましい。具体的には、目的とする GANP 遺伝子を有する各種哺乳動物由

来のG A N P遺伝子を発現させうる各種プロモーターの下流に、該G A N P遺伝子を連結したベクターを、対象となる哺乳動物の受精卵（例えば、マウス受精卵）へマイクロインジェクションすることによって、目的とするG A N P遺伝子を高発現するトランスジェニック哺乳動物を作製することができる。

G A N P遺伝子の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。遺伝子発現の調節を行うプロモーターとしては、たとえばウイルス（サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JC ウィルス、乳癌ウィルス、など）由来遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来遺伝子〔例えば、アルブミン、インスリン II、エリスロポエチン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチン K1, K10 および K14、コラーゲン I 型および II 型、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミン β -水酸化酵素、内皮レセプターチロシンキナーゼ、ナトリウムカリウムアデノシン 3 リン酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネイン I および IIA、メタロプロティナーゼ 1 組織インヒビター、MHC クラス I 抗原、平滑筋 α アクチン、ポリペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α)、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖 1 および 2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイド P コンポーネント、ミオグロビン、レニンなどの遺伝子〕のプロモーターなどが挙げられる。上記ベクターは、トランスジェニック哺乳動物において目的とするメッセンジャー RNA の転写を終結するターミネターを有していてもよい。その他、G A N P 遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流 に連結することも所望により可能である。本発明の好ましい態様では、ヒト免疫グロブリン遺伝子イント

ロンエンハンサー部分をG A N P 遺伝子の5'側に連結することにより、G A N P 遺伝子をB細胞で選択的に発現させることができる。

受精卵細胞段階におけるG A N P 遺伝子の導入は、対象の哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保することが好ましい。トランスジェニック後の作出動物の胚芽細胞においてG A N P 遺伝子が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てにG A N P 遺伝子を過剰に有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにG A N P 蛋白質を過剰に有する。導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該遺伝子を安定に保持し、また、該遺伝子を過剰に有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

トランスジェニック対象動物が有する内在性の遺伝子とは異なる遺伝子である外来性G A N P 遺伝子を対象非ヒト哺乳動物（好ましくはマウスなど）またはその先祖の受精卵に転移する際に用いられる受精卵は、同種の雄哺乳動物と雌哺乳動物を交配させることによって得られる。受精卵は自然交配によっても得られるが、雌哺乳動物の性周期を人工的に調節した後、雄哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌哺乳動物の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば初めに卵胞刺激ホルモン（妊馬血清性性腺刺激ホルモン（P M S G））、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（h C G））を例えば腹腔注射などにより投与する方法が好ましい。

得られた受精卵に前述の方法により外来性G A N P 遺伝子を導入した後、雌哺乳動物に人工的に移植・着床することにより、外来性遺伝子を組み込んだDNAを有する非ヒト哺乳動物が得られる。好ましくは、黄体形成ホルモン放出ホルモン（L H R H）を投与後、雄哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌哺乳動物に得られた受精卵を人工的に移植・着床させる方法が好ましい。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニ

ック動物個体の産出高率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNAのマイクロインジェクションが好ましい。

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（マウスの場合には、例えば、尾部先端）からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入遺伝子の存在を確認することができる。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代（Founder）とすれば、導入遺伝子はその子（F1）の50%に伝達される。さらに、このF1個体を野生型動物または他のF1動物と交配させることにより、2倍体染色体の片方（ヘテロ接合）または両方（ホモ接合）に導入遺伝子を有する個体（F2）を作成することができる。

あるいは、GANP蛋白質高発現トランスジェニック哺乳動物は、上記したGANP遺伝子を導入遺伝子としてES細胞に導入することによって作製することもできる。例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）に由来するHPRT陰性（ヒポキサンチン・グアニン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES細胞（embryonic stem cell）に、GANP遺伝子を導入する。該GANP遺伝子がマウス内在性遺伝子上にインテグレートされたES細胞をHATセレクション法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする。該胚盤胞を仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。そうして該仮親マウスから、キメラトランスジェニックマウスが生まれる。該キメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることによりヘテロトランスジェニックマウスを得ることができる。該ヘテロトランスジェニックマウス同士を交配することにより、ホモトランスジェニックマウスが得られる。

上記した本発明のトランスジェニック哺乳動物の子孫、並びに該トランスジェニック哺乳動物の一部も本発明の範囲内である。トランスジェニック哺乳動物の一部としては、該哺乳動物の組織、器官及び細胞などが挙げられ、器官または組織としては、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄あるいは扁桃腺などが挙げられ、細胞

としてはB細胞などが挙げられる。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、B細胞をさらに活性化する哺乳動物と交配することも可能であり、これによりさらに高親和性抗体を産生することが可能である。例えば、自己免疫疾患マウスであるとされる MRL/lpr, NZB, (NZB x NZW)F1 などを用いればさらに高い変異誘導を期待できる。最近、MRL/lpr マウスでB細胞が末梢のリンパ節での活性化の際に胚中心を経過したあとT細胞領域でさらにV領域の突然変異誘導が更新していることが報告されている。また、本発明者らも MRL/lpr マウスにおいてG A N P 遺伝子がこのように発現していることを見出している。このことを利用して MRL/lpr マウスのG A N P トランスジェニックマウスを作成することによって、スーパー高親和性抗体産生マウスとなる可能性がある。本発明のG A N P 遺伝子過剰発現トランスジェニック哺乳動物とさまざまな自己免疫疾患モデル動物との交配により、高親和性抗体を産生できる哺乳動物を作製することができる。

(2) 高親和性抗体の作製

本発明でいう抗体とは、抗原と特異的に結合する活性を有する蛋白質を意味し、好ましくはB細胞が産生するものである。本発明では、抗原に対する反応性が高い抗体のことを高親和性抗体と言う。

抗体分子の親和性亢進は抗体遺伝子の可変領域（V領域）遺伝子に体細胞突然変異（S H M）が誘導することによって生まれる。抗体の抗原に対する特異性は抗原を生体に免疫した当初から認められるが、初期の抗体の多くはI g Mクラスであり、また抗原に対する結合親和性は高くなく、病原体や異物を除去したり、不可化する能力は低い。しかし、抗原を生体に投与して数回の追加免疫によって抗体の抗原に対する結合親和性が高まる。この際、B細胞はT細胞からの刺激が必要で、末梢のリンパ組織の胚中心領域でその活性化が行われるとされている。V領域遺伝子の突然変異誘導に必要な分子としては最近、胚中心で発現するR N A エディティング分子A I Dが必要であると報告されている。さらに、D N A ウ

ラシルグリカーゼ、またDNA複製に必要なDNAポリメラーゼとしてミスを生じやすいDNAポリメラーゼゼータとアイオタが関与していることが報告されているが、これらの機能を制御する分子はまだ明らかにされていない。GANP分子は新たなSHM誘導分子としてその機能を明らかにしたもので、その分子の発現上昇がSHM誘導に重要な鍵を握る。とりわけ、高親和性抗体を産生するために重要であることが明らかになった。

C57BL/6マウスにハプテン・キャリアの抗原としてニトロフェニル鶏γグロブリンを免疫すると誘導される抗体は、H鎖はVH186、2ローカスを用い、L鎖はλ1である。この際、追加免疫をして得られる抗体はIgG1抗体であり、そのうち特に結合親和性の高い抗体のV領域配列に誘導される突然変異は33番目のトリプトファンがロイシンに変異したものであることが知られている。本明細書の実施例ではこのモデルシステムで高い高親和性型のV領域突然変異が誘導されており、これは、高親和性抗体が誘導されたことを示す分子レベルでの明らかな証拠である。

即ち、上記(1)に記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与して抗体を産生することによって高親和性抗体を産生することができる。即ち、GANP蛋白質を高発現させた動物に目的とする抗原を常法によって投与し、感作された動物の脾臓のリンパ球より高親和性抗体を調製することができる。高親和性抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。

ポリクローナル抗体を産生する方法としては、例えば、抗原を本発明のトランスジェニック哺乳動物に投与し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。免疫感作の方法は当業者に公知であり、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。抗原投与は、例えば7～30日間隔で2～3回投与すればよい。投与量は1回につき、例えば抗原約0.05～2mg程度とすることができる。投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹膜腔内もしくは皮下に注射することによ

り投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等に応じてアジュバントを使用しない場合もある。

免疫感作した哺乳動物を一定期間飼育した後、該哺乳動物の血清をサンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、例えば $100\mu\text{g} \sim 1000\mu\text{g}$ の抗原を用いて追加免疫を行なうことができる。最後の投与から1～2ヶ月後に免疫感作した哺乳動物から血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウム又はポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の常法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、ポリクローナル抗体を得ることができる。

モノクローナル抗体を産生する方法としては、ハイブリドーマ法を挙げることができる。先ず、アジュバント中に目的とする抗原を構成するペプチドを懸濁し、該懸濁液を、免疫動物（即ち、本発明のトランスジェニック哺乳動物）の皮下または真皮内に投与する。用いられるアジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート（TDM）、リポ多糖（LPS）、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、フロイントの完全アジュバント（CFA）とフロイントの不完全アジュバント（IFA）とを組み合わせ使用することが好ましい。

モノクローナル抗体の産生において、免疫動物は抗原の初回免疫後、更に、追加免疫を数回行い、適当な日数を経過した後に部分採血を行い、抗体価を測定することが好ましい。本発明の方法で産生される抗体は高親和性抗体であるため、上記免疫は初回のみで十分である可能性がある。なお、抗体価は、例えばELISA法等、公知の方法により測定することができる。

次いで、感作の終了した免疫動物から脾臓を摘出し、B細胞を得る。この際、

抗原に結合するB細胞を得ることが、その後のスクリーニングの軽減の点から好ましい。ここで得られるB細胞は高親和性抗体産生細胞であり、これをそのまま免疫賦活剤として使用することもできる。また直接、V領域遺伝子を得て、そのV領域の体細胞突然変異を測定することもできる。次いで、B細胞を常法に従いミエローマ細胞と融合させて抗体産生ハイブリドーマを作製する。例えば、マウスの場合であれば、頸椎脱臼によって屠殺し、脾臓を摘出し、摘出した脾臓を、例えば、ハンクスの平衡塩溶液（HBSS）中に置き、ピンセットで細胞を押し出して脾臓リンパ球（B細胞）を得る。得られた脾臓リンパ球は、トリパンブルー等の染色液で染めて生細胞数をカウントし、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマとする。

用いられるミエローマ細胞は特に限定されず、公知のものを使用できる。例えば、P3-X63-Ag8-01（X63）、P3-NS1-1-Ag4-1（NS1）、SP2/0-Ag14（SP2/0）等を挙げることができる。ミエローマ細胞の選択にあたっては、抗体産生細胞との適合性を考慮する必要がある。

細胞の融合方法は、センダイウイルス法、ポリエチレングリコール法、プロトプラスト法等、当該分野で公知の方法を任意に選択して用いることができるが、特にポリエチレングリコール法が、細胞毒性が比較的少なく、融合操作も簡単であるという理由から好ましい。なお、抗体を大量に作り出したい場合は、ビニルピリジン誘導体で刺激した抗体産生細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマを用いることが好ましい。

得られたられたハイブリドーマは、常法に従い、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン含有培地）中で適当な期間培養し、ハイブリドーマの選択を行う。次いで、目的とする抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った後、該ハイブリドーマのクローニングを行う。

スクリーニング法としては、公知の抗体検出方法を用いることができ、例えば、酵素免疫アッセイ（以下「ELISA」という）法、ラジオ免疫アッセイ（以下「RIA」という）法、プラーク法、凝集反応法等を用いることができる。ま

た、クローニング法としては、当該分野で公知の方法を用いることができ、例えば、限界希釈法、軟寒天法およびFACS法等を用いることができる。得られたハイブリドーマは、適当な培養液中で培養するか、あるいはハイブリドーマと適合性のある、例えばマウス腹腔内に投与する。こうして得られる培養液中または腹水中から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィー等により、所望のモノクローナル抗体を単離精製することができる。

また、上記した抗体の断片も本発明の範囲内である。抗体の断片としては、前述したポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、 sFv 、 $dsFv$ (disulphide stabilised Fv) あるいは dAb (single domain antibody) 等が挙げられる。ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 Fab' 」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはパパイニン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、 IgG をパパイニンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて V_L (L鎖可変領域) と C_L (L鎖定常領域) からなるL鎖、及び V_H (H鎖可変領域) と $C_H\gamma 1$ (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 Fab' という。また IgG をペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの Fab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

本発明の高親和性抗体はヒト型化抗体やヒト抗体でもよい。これらの抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えた哺乳動物を用いて、該哺乳動物を免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することができる。

本発明の抗体のアイソタイプは特に限定されず、例えば、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD または IgE の任意のアイソタイプを有することができる。

(3) 高親和性抗体の利用

上記(2)に記載した高親和性抗体は、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤として有用である。

(i) 疾患の診断

本発明の抗体を用いた各種疾患の診断方法は、各種疾患の疑いのある被験者から採取した検体、例えば血清等と本発明の抗体とを抗原抗体反応によって結合させ、結合した抗体量により検体中の目的とする抗原の量を検出することにより行う。抗体量の検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比ろう法、免疫比濁法等を用いることができる。特に標識免疫測定法が簡便かつ高感度という点で好ましい。標識免疫測定法では、検体中の抗体価は標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として用いて相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を同測定系にて同時に測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的に表すことができる。

標識免疫測定法としては、公知の測定法、例えば、ELISA法、RIA法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法等を任意に利用することができる。用いる標識物質は、上記測定法に応じて、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、および化学発光化合物等を適宜選択すればよい。前記酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等を挙げることができる。上記標識物質はアビジン-ビオチン複合体を用いることにより、標識物質の検出感度を向上させることも可能である。また、放射性同位体としては、主に¹²⁵Iが、蛍光化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やテトラメチルローダミンイソチオシアネート (RITC) 等が挙

げられる。化学発光化合物としては、ロフィン、ルミノール、ルシゲニン等が挙げられる。上記標識物質による抗体の標識は、常法に従って行うことができる。以下、標識抗体を用いた標識免疫測定法について説明する。

標識免疫測定法による、各種疾患を検出する方法としては、公知の非競合反応系あるいは競合反応系を用いて行うことができる。非競合反応系においては、固相が必要である（固相法）。競合反応系においては、必ずしも固相を必要としない（液相法）が、固相を用いた方が、測定操作が簡便になるため好ましい。固相の材質としては、例えば、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されず、標識免疫測定法に用いられる公知のものを任意に用いることができる。

非競合反応系の場合、測定操作は、検体または本発明の抗体を固相化した後、本発明の抗体または検体と反応させ、次いであらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）を加えて固相化した検体と反応している抗体と反応させる。この二次抗体の標識により、検体に結合した抗体量を検出することができる。検出された標識化二次抗体の量は、検体中の目的とする抗原の量と正相関するので、これにより検体中の目的とする抗原の量を求めることができる。

競合反応系では、一定量の抗体に対して、検体と一定量の目的とする抗原を競合的に結合させる。例えば、検体を固相化した後に、あらかじめ目的とする抗原を添加し反応させた本発明の抗体と反応させる。次に、固相化された検体と反応した抗体を、あらかじめ標識しておいた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）と反応させ、標識物質によって抗体の量を検出することができる。検出される標識量は、添加された目的とする抗原の量と逆相関する。そのほかの競合反応系としては、本発明の抗体を固相化して、これに検体と反応させた後、あらかじめ標識しておいた目的とする抗原を反応させる。検出される標識量は、抗体と結合した検体中のG A N P蛋白質量と逆相関する。

前記した抗原または抗体の固相化法としては、物理的吸着法、共有結合法、イ

オン結合法、架橋法等、公知の方法を使用できる。特に、物理的吸着法が簡便という点で好ましい。また、抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）としては、例えば、抗 IgG 抗体、抗 IgM 抗体等を用いることができる。これらの抗体は、抗体分子をそのまま使用してもよいし、あるいは抗体を酵素処理して得られる抗原結合部位を含む抗体フラグメントである Fab、Fab'、F(ab')₂ を使用してもよい。さらに、標識した抗免疫グロブリン抗体の代わりに、抗体分子に特異的な親和性をもつ物質、例えば IgG に特異的な親和性をもつプロテイン A 等を標識して使用してもよい。

前記標識免疫測定法の好適な例として、酵素を標識とした免疫測定法、E L I S A 法を挙げることができる。E L I S A 法は、例えば、96 穴プレートに検体またはその希釈液を入れて、4℃～室温で一晩、または 37℃で 1～3 時間程度静置して検出すべき G A N P 蛋白質を吸着させて固相化する。次に、本発明の抗体を反応させ、次いであらかじめ酵素を結合させた抗免疫グロブリン抗体（二次抗体）を反応させる。最後に酵素と反応する適当な発色性の基質（例えば、酵素がホスファターゼなら p-ニトロフェニルリン酸等）を加え、この発色によって抗体を検出する。

また、本発明の高親和性抗体を利用することにより、各種疾患の治療薬の薬効評価を行うことができる。本発明の高親和性抗体を利用した薬効評価方法は、各種疾患患者あるいは各種疾患モデル動物に対して薬剤を投与後、これら生体中のウイルス等の抗原の量を本発明の抗体を用いて検出し、その量を比較することにより、生体中の抗原の量を通して各種疾患の治療薬としての薬効を評価することができる。

本発明の高親和性抗体は、各種疾患診断用キットの形態で提供することができる。該キットは、本発明の診断方法や本発明の薬効評価方法に使用することができる。本発明のキットは以下の（a）及び（b）から選ばれる少なくとも一つ以上を含む。

（a）本発明の抗体またはその標識物

(b) 前項 (a) 記載の抗体またはその標識物を固定した固相化試薬

ここで、抗体の標識物とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、または化学発光化合物によって標識されたものを意味する。

また本発明のキットにおける抗体、もしくはこれらの標識物を固定する固相の材質としては、ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セルロース等が挙げられ、固相の形状としては、球状、ウェル状、チューブ状、シート状等が挙げられるが、これらに限定されない。該固相化試薬の代わりに、固相と固相化に必要な固相化試薬を添付したものでもよい。固相化試薬として、例えば物理的吸着による固相化の場合は、50mM 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6)、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5、100mM 塩化ナトリウム含有)、PBS 等のコーティング液と、さらに必要に応じてコーティング液に 0.5% のゼラチン等を含有させたブロッッキング液が挙げられる。

また、本発明のキットにおける抗体は、PBS 等に溶解させた状態、あるいはゲルに結合させた状態 (以下、「吸収用ゲル」と略す) であってもよい。前記吸収用ゲルはさらに適量を、バッチ法による吸収処理用に 0.5~2ml 程度のマイクロ遠沈チューブに予めパッケージングされた状態であってもよく、あるいはカラム法による吸収処理用にカラム容量が 0.1~5 ml のミニカラムに予め充填された状態であってもよい。

本発明のキットは、上記した構成要素のほか、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質 (発色性基質等)、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釈液等を含んでいてもよい。前記検体用希釈液としては、例えば PBS (生理的リン酸緩衝液、pH 7.4)、137mM 塩化ナトリウムおよび 3mM 塩化カリウムを含む pH7.4 かつ 20mM のトリス-塩酸緩衝液 (以下、「TBS」と略す)、0.05% Tween20、0.1~1% の BSA を含有させた PBS、あるいは TBS 等を挙げることができる。該検体用希釈液は、検体希釈以外、例えば抗体の希釈等に用いてもよい。

(i i) 疾患の治療又は予防

本発明の高親和性抗体は、疾患の病原となる抗原の活性を中和させる作用を有するものであれば、疾患の治療又は予防のためにも有用である。本発明の薬剤は、本発明の高親和性抗体またはその断片を有効成分として含み、さらに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トロー剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該薬剤に含有される活性成分である高親和性抗体の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から 1000mg 、好ましくは $10\mu\text{g}$ から 100mg の範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。

例えば、注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ ml 担体 $\sim 10\text{mg}$ 抗体/ ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回 \sim 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製する

こともできる。そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

(4) 本発明の応用

本発明者らは、B細胞腫瘍株に対するGANP過剰発現を誘導した上での解析を行った結果、遺伝子導入で飛躍的なV領域遺伝子の体細胞突然変異誘導効果があることが判明した。この効果は、RNAプライマーゼに必要な502番目のセリンのリン酸化が起らないような変異遺伝子を用いた場合には見られないことから、RNAプライマーゼ活性が必要であることを示している。この結果は、臨床的な補助免疫賦活として特異的抗体産生の増強効果を示すものである。ベクターとしてレトロウイルスベクターを使用し、CD40、BAFFなどのTNFファミリー分子を介する刺激を併用することも効果的である。この遺伝子導入を骨髓細胞レベルで行うことによってT細胞における高親和性結合も期待できる。エイズ、C型肝炎ウイルス、成人T細胞白血病、狂牛病などの高親和性抗体が得られないか、得られたとしてもすぐに抗原の変異が起るために十分に高親和性抗体の産生が持続できない場合にはこの遺伝子導入は優れた効果を発揮すると期待できる。

本発明のGANP遺伝子過剰発現哺乳動物は、生物学研究試薬、臨床検査試薬作成に有効なモノクローナル抗体の開発に有効である。例えば、特定のシグナル伝達分子に対するモノクローナル抗体を機能ドメインや機能モチーフに特異的にそして結合力の高い高親和性抗体を簡便に作成することは非常に活用される範囲が広い。多くの抗体はそれほど多くのスクリーニングをかけないため、ウエスタン解析と免疫沈降に用いることができない場合がある。この場合、本発明のトランスジェニック哺乳動物を用いれば、比較的少ないクローンの抗体から高親和性抗体産生細胞を短時間で選別することができ、経費、時間、労力の削減する効果

は大きい。特にリン酸化抗体、遺伝子変異部分に対する特異抗体の作成は診断薬、あるいは抗体を用いた薬物の選択的注入法に応用できる。また遺伝子の配列やヌクレオチド部分に選択的に結合する高親和性抗体の産生も可能となる。抗原のモチーフは無機物、炭水化物、化学合成物など、任意の物質の立体構造の一部を認識する。従来には高親和性抗体は得られていないが、自己免疫疾患マウスとの交配で作成されるマウスは、あらゆる抗原に対して高親和性抗体を得るために有効である。この方法で結合力が 10^{-11} M オーダーの高親和性抗体ができる可能性があり、ELISA 法の技術開発を導入することにより、微量物質の検出を簡便に行う技術を開発することが可能である。

また、本発明によれば、RNA プライマーゼ不活性型 G A N P 遺伝子を含む、アレルギー疾患又は自己免疫疾患のための遺伝子治療剤を提供することも可能である。本発明の遺伝子治療剤は、RNA プライマーゼ不活性型 G A N P 遺伝子を含む組み換えベクターを、遺伝子治療剤に用いる基剤と一緒に配合することにより製造することができる。組み換えベクターの構築の際に用いるベクターとしては、ウイルスベクターとしてレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターなどが挙げられ、あるいは動物発現用プラスミドを使用することもできる。ベクターは好ましくはウイルスベクターである。RNA プライマーゼ不活性型 G A N P 遺伝子をウイルスベクターに組み込んだ場合は、組換え体 DNA を含有するウイルス粒子を調製し、遺伝子治療剤に用いる基剤と一緒に配合することにより遺伝子治療剤を製造することができる。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤を使用することができ、例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等が挙げられる。あるいはまた、当業者に既知の常法に従って、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH調整剤、植物油、もしくは界面活性剤等の助

剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製することもできる。これらの注射剤は、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

本発明の遺伝子治療剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内等の全身投与でもよいし、局所注射又は経口投与等の局所投与を行ってもよい。本発明の遺伝子治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たり組み換え遺伝子の重量として $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $1000\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。投与回数は特に限定されない。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

実施例 1 :

(材料及び方法)

1. 動物

NZB、NZW、B/WF1、MRL/lpr、及び BXSB マウスは Japan SLC Co. から購入した。C57BL/6 及び BALB/c マウス Charles River Japan から購入した。NOD マウスは大阪大学の宮崎博士から供与された。

2. 抗体及び試薬

マウス B220 (RA3-6B2)、マウス IgM (AM/3) 及びマウス IgD (CS/15) に対するラットモノクローナル抗体はハイブリドーマの培養上清から精製し、D-ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Roche diagnostics, Branchburg, NJ) で標識した。ビオチン標識ラット抗マウス Syndecan-1 及び抗マウス CD5 モノクローナル抗体は購入した (BD PharMingen, San Diego, CA)。ビオチン標識ピーナツアグルチニン (PNA) は Vector Laboratories (Burlingame, CA) から購入した。

3. 免疫

トリニトロフェニル-keyhole limpet hemocyanin (TNP-KLH) 及び TNP-Ficoll は Biosearch Technologies (Novato, CA) から購入した。完全フロイントアジュバンドに乳化した $100\mu\text{g}$ の TNP-KLH または PBS 中の $25\mu\text{g}$ の TNP-Ficoll を腹腔内に注入した。14日後、リンパ器官を取得し、免疫組織分析用に OCT 化合物とともに凍結した。

4. 免疫組織分析

$6\mu\text{m}$ の凍結切片をアセトンで5分間固定し、PBS 中の 3% BSA で15分間ブロッキングし、ラット抗マウス GANP モノクローナル抗体 (42-23) [Kawahara K., 他、2000, *Blood* 95: 2321-2328] またはラット抗-pSer⁵⁰² GANP モノクローナル抗体 (PG/103) [Kawahara K., 他、2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10279-10283] と一緒に1時間インキュベートした。スライドを PBS で数回洗浄し、アルカリホスファターゼ (ALP)-結合ヤギ抗ラット IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) と一緒にインキュベートした。発色は Vector Blue kit (Vector) を用いて行った。二重染色のためには、反応はビオチン標識抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)-結合ストレプトアビジン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を組み合わせて行った。3-3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB; 同仁化学) による発色後、切片を PBS 中 1% グルタルアルデヒドで1分間固定した。Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany) をマウンティングのために用いた。インビボで増殖活性のある細胞を検出するために、ブロモデオキシウリジン (BrdU) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO; $1\text{mg}/\text{mouse}$) を殺す2時間前に静脈内に注入した。DNA 合成を行う細胞を抗 BrdU モノクローナル抗体 (BD PharMingen) と ALP-結合ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Sigma) とを組み合わせて染色し Vector Red (Vector) により発色させて検出した。PAS 染色は既報の通り行った [Jiang Y. 他、1997, *J. Immunol.* 158: 992-997]。

(結果)

1. MRL/lpr マウスのリンパ節における GANP^{hi} 細胞の出現

GANP 発現は自己免疫傾向の高活性 B 細胞で高発現している。高レベルの GANP を発現するリンパ細胞 (GANP^{hi} 細胞) は、MRL/lpr マウスの末梢リンパ節において非免疫状態において自発的に出現する。C57BL/6 マウスと比較して増加は顕著であり、非免疫条件下では GANP^{hi} 細胞は示されない (図 1)。そのような GANP^{hi} 細胞の出現を、加齢の間少しずつ自己免疫状態を引き起こす NZB マウスのリンパ節で調べた。若い NZB マウス (7 週齢) は、膝窩リンパ節に GANP^{hi} 細胞を有さないが、加齢した NZB (40 週齢) は多数の GANP^{hi} 細胞を有した。

GANP RNA-プライマーゼ活性は B 細胞の活性化と分化で重要な役割を担っている可能性がある。そこで、NZB マウスで抗 pSer⁵⁰² モノクローナル抗体を用いて、RNA プライマーゼ活性の重要なリン酸化部位である Ser⁵⁰² のリン酸化状態を比較した [19]。GANP の発現は 8 週目で顕著であり、GANP^{hi} 細胞が 32 週までの全期間を通じて検出された (図 2 ; 上図)。対照的に、pSer⁵⁰²-陽性細胞は 8 週目に最大であったが、その後、陽性細胞は顕著に減少した (図 2 ; 真中の図)。ピーク年齢に基づく顕微鏡観察での反応性細胞数を図に示す (図 2 ; 下図)。これらも結果から、GANP 発現は最初に RNA-プライマーゼ活性を伴うが、この活性は長期間に渡っては調節されていないことが分かる。

2. 自己免疫傾向マウスの脾臓の赤脾髄における GANP^{hi} 細胞の自発的出現

自己免疫傾向 NZB マウスの膝窩リンパ節で検出された GANP^{hi} 細胞が非免疫状況下の脾臓に出現するかどうかを調べた。GANP^{hi} 細胞は 4 週目に脾臓に出現し、細胞数は 12 週目に最大値に達したが、24 週後に消失した (図 3 ; 上図)。pSer⁵⁰² GANP の発現も 8 週目と 12 週目に検出された (図 3 ; 真中の図)。赤脾髄の相対細胞数と比較した結果、脾臓に出現した GANP^{hi} 細胞は 12 週後には末梢リ

リンパ節に移動していることが分かる。G A N P^{hi} の増加は、自己免疫疾患の発症に先行する自己抗体の産生量に比例している（図 2 及び図 3 ;Theofilopoulos A. N., 他、1985, *Adv. Immunol.* 37: 269-390)。

G A N P^{hi} 細胞の出現は自己免疫傾向マウスにおける B 細胞の異常と関連している可能性があるので、非免疫条件下で各種の自己免疫傾向マウス（8 週齢）における G A N P^{hi} 細胞の出現を調べた。G A N P^{hi} 細胞は MRL/lpr、NZB 及び B/WF1 で顕著に増加していた。G A N P^{hi} 細胞の数は SLE-モデルマウスの BXSb 及び NOD ではそれほど増加しなかったが、対照の BALB/c マウス（図 4） 及び C57BL/6 マウス（図 1）と比較すれば増加していた。脾臓の切片は、GC 様構造として PNA⁺ B 細胞の連想又は未熟の会合を示した。GC 様領域での G A N P の発現は、正常 C57BL/6 マウス及び BALB/c マウスに TD-Ags を免疫することによって作製した GC と比較して高くない。しかし、G A N P^{hi} 細胞は、自己免疫傾向マウスの赤脾髄領域で顕著に出現していた（図 4）。

G A N P^{hi} 細胞集団を、リンパ系細胞のマーカー分析によってさらに解析した。それらは B220⁺ Syndecan-1⁺ の表現型を発現し、多量の IgM を細胞中に発現する（図 5）。CR1、Thy-1、GL-7、CD23 及び PNA については陰性であり、これらの結果から、G A N P^{hi} 細胞が B 系細胞の後期成熟段階、おそらく形質細胞であることが示される。この細胞が増殖性形質プラスト胚細胞であるかどうかを調べるために、NZB マウスに BrdU を静脈内注入し、インビボで BrdU を取り込ま細胞ために 2 時間インキュベートした後に殺して脾臓切片を調製した。G A N P^{hi} 細胞は BrdU 取り込みについて陽性ではないことから（図 6）、これらの細胞は増殖性ではなく、形質胚細胞段階より成熟していることが示唆された。

B-1 細胞の異常な分化として、Mott 細胞形成が自己免疫傾向マウスで観察される。Mott 細胞は形質細胞の異常な形態であり、多量の IgM 分子が、PAS 染色により細胞質内 Russell 体として検出される粗面小胞体結合小胞に蓄積している [Jiang Y., 他、1997, *J. Immunol.* 158: 992-997]。G A N P^{hi} 細胞は PAS-染色で染色されず（図 6）、これにより G A N P^{hi} 細胞を B-1 細胞由来形質細胞の Mott

細胞と区別できる。脾臓 $GANP^{hi}$ 集団は CD5 発現が陰性であり(図 6)、NZB マウス(12週)から得た腹膜細胞は $GANP^{hi}$ 細胞について陰性であったことから、B-1 細胞は多量の $GANP$ を発現していないことが示される。これらの結果から、 $GANP^{hi}$ 細胞は自己免疫状態で高活性の B 細胞に分類され、この集団が B-1 細胞の起源とは異なる起源の系統であることが示唆される。

3. TD-Ag での免疫による正常マウスにおける $GANP^{hi}$ 細胞の誘導

二次リンパ器官における $GANP^{hi}$ 形質細胞の出現が自己免疫傾向マウスに限られているかどうか調べた。数は非常に少ないが、 $GANP^{hi}$ 形質細胞集団は、TD-Ags による免疫によって正常 C57BL/6 及び BALB/c マウスの脾臓においても誘導される(図 7)。T 細胞依存性 Ag (TI-Ag) による免疫はそのような細胞の誘導において効果は少ない。 $GANP^{hi}$ 細胞集団は $B220^{lo}IgM^{hi}IgD^{lo}GL-7^{lo}PNA^{lo}CD5^{lo}CD40^{lo}$ と同様の表現型を示したが、Syndecan-1⁺を示した。これらの結果から、自己免疫傾向マウスにおける $GANP^{hi}$ 形質細胞の生成は、TD-Ag に対する免疫応答のために提供される同様に刺激によって誘導されることが示される。GC で増殖と分化を経た Ag 駆動 B 細胞は、 $GANP$ を発現しながらより長い間、形質細胞段階として赤脾髄領域に局在化している可能性がある。

実施例 2 :

(方法)

1. Daudi 細胞への安定なトランスフェクション

10 μ g の線状化した pCXN-2 マウス $ganp$ 又は $ganpS/A502$ cDNA を Daudi 細胞に、Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いてエレクトロポレーションした。48 時間後、G418 (Promega; 1 mg/ml) により選択を開始して、マウス $GANP$ を安定に発現する Daudi 細胞を得た。

2. Daudi トランスフェクタントの Ig V_H 転写物の分析

全 RNA を全細胞から Trizol (Invitrogen) を用いて抽出した。cDNA を既報の通り取得した (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。LV_H3- C_H1C_μ 転写物を 5' -LV_H3 プライマー (5' -CTATAACCATGGACCATGGACATACTTTGTT CC-3') 及び 3' -XbaI-C_H1-C_μ プライマー (5' -TGCATGCATTCTAGAGTTGCCGTTGGGGTGCTGGAC-3') により Pfu Turbo (Stratagene) を用いて増幅した。PCR 産物を NcoI 及び XbaI で消化し、ゲルで精製し、NcoI-XbaI で消化したプラスミドとライゲーションした。コンピテント細菌に形質転換後、QIAprep キット (QIAGEN) を用いて調製した少量のプラスミド DNA の塩基配列を自動シーケンサー (Applied Biosystems) により決定した。

3. GANP-トランスジェニック (Tg) マウスの作製

導入遺伝子は、pLG ベクターの XhoI サイトに 5.6 kb のマウス GANP 遺伝子を導入して作成した。このベクターはヒト免疫グロブリンイントロンエンハンサー領域 (2 kb EcoRI フラグメント) を持ち、B 細胞での強力な発現を行う、特異的ベクターである。この遺伝子を直線化してマウスに遺伝子導入を行った。マウス g a n p 全長 cDNA を含む線状化した pLG vector (Koike, M. et al. Int. Immunol. 7, 21-30 (1995)) を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。マウスの尾のゲノム DNA および 1-5' プライマー (5' -TCCCGCCTTCCAGCT GTGAC-3') と 1-3' プライマー (5' -GTGCTGCTGTGTTATGTCCT-3') を用いて導入遺伝子の存在についてスクリーニングした。

4. RT-PCR

全 RNA の調製及び cDNA 合成は既報の通り行った (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。GANP 転写物は上記した 2 種のプライマー 1-5' 及び 1-3' により検出した。β-アクチンを用いて RNA の回収をモニターした。

5. CD19-Cre+/GANP flox マウスの樹立

GANPゲノムDNAを用いて、エクソンIIの下流にネオマイシン耐性遺伝子(neo)を挿入することによってターゲティングベクターを調製した。loxP部位を、neoの3'側の隣接領域とエクソンI及びIIの間のイントロンに導入した。直線化したターゲティングベクターをTT2 ES細胞(Yagi, T. et al. Anal. Biochem. 214, 70-76 (1993))にエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。G418で選択後、ESコロニーを拾い上げ、プロテナーゼKと一緒にインキュベートした。相同組換え体をneo2プライマー(5'-GCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT-3')及びCGK3'-2プライマー(5'-GGCACCAAGCATGCACGGAGTACACAGA-3')によりスクリーニングした。相同組み換えは、BamHIで消化したESクローンのDNAをプローブAを用いてサザンブロット分析することにより確認した。4 kbのバンドを示す3個の陽性クローンを用いて、ICR胚盤胞へのマイクロインジェクションによりキメラ初代マウスを作製した。B細胞におけるganp遺伝子を欠失した細胞のために、GANP-floxedマウスとCD19-Creノックインマウス(Rickert, R. C., et al., Nucleic Acids Res. 25, 1317-1318 (1997))とを交配した。

6. FACS 分析

リンパ器官由来の単一細胞懸濁物を、各ビオチン標識モノクローナル抗体により氷上で1時間染色した。染色バッファーで洗浄後、細胞をFITC結合ストレプトアビジン(Amersham Bioscience)及びPE結合モノクローナル抗体で1時間インキュベートした。リンパ細胞を、CellQuestソフトウェアを用いてFACSscan(Becton Dickinson)により分析した。

7. B細胞の精製

脾臓細胞を野生型マウス及びGANP^{-/-}B-マウス(7から8週齢)から単離し、

0. 15 M 塩化アンモニウム緩衝液で処理して赤血球を除いた。プラスチック皿上で 37℃で30分間インキュベーションした後、未接着細胞をリンパ球として回収し、T細胞を Dynabeads-anti-mouse Thy1.2 モノクローナル抗体(Dynal)を添付のプロトコールに従って使用して除去した。B細胞の純度(90%以上)を FITC 結合抗 B 2 2 0 モノクローナル抗体(BD Pharmingen)を用いた細胞表層染色により確認した。

8. インビトロ増殖アッセイ

精製したB細胞を、10%熱不働化FCS(JRH Biosciences)、2 mM のL-グルタミン及び 5×10^{-5} M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地（分裂促進剤を含むものと含まないもの）中において、96穴マイクロタイタープレートで 2×10^5 細胞/ウェルで48時間インキュベートした。細胞を、0.2 μ Ci/ウェルの [3 H]-チミジン(ICN)で16時間パルスしてから回収し、取り込まれた放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

9. 抗原及び免疫

TNP-KLH、TNP-Ficoll 及び NP-CG (23:1)は、Biosearch Technologies から購入した。50 μ g の TNP-KLH 及び NP-CG （アルミニウムで沈殿）、又は25 μ g の TNP-Ficoll (PBS に溶解)を野生型及びG A N P^{-/-} B-マウスの腹腔内に注入した。

10. 抗原特異的抗体産生の測定

抗原投与の10日後と14日後に、免疫したマウスから血清を回収した。5 μ g/ウェルの TNP-BSA (Biosearch Technology) を ELISA プレートに被覆した。各ウェルをPBS中の3% BSA でブロッキングし、段階希釈した血清とインキュベートした。PBS-0.1% Tween 20 で洗浄後、ウェルをビオチン結合 isotype 特異的モノクローナル抗体及びアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビジン (Southern Biotechnology) とともにインキュベートした。発色は基質の存在下で

行った。

1 1. $V_H186.2$ 遺伝子の配列分析

NP-CG で免疫したマウスの NIP-結合 $IgG1^{low}CD38^{low}$ B 細胞を、FACS Vantage (Becton Dickinson) で分画し、プロテナーゼKと一緒に $37^{\circ}C$ で一晩インキュベートした。ライセートを用いて、PCR を既報の通り (Takahashi, Y., et al. Immunity 14, 181-192 (2001)) 2回実施した。 V_H 遺伝子 cDNAs を pBluescript にライゲーションし、自動シーケンサーにより配列を決定した。

(結果)

1. Daudi にマウス GANP を安定的に発現させたトランスフェクタントの V 領域遺伝子の体細胞突然変異 (SHM)

GANP 遺伝子を、インビトロで SHM の分析に使用される各種ヒト B リンパ球細胞に導入した (Rogozin, I. B., et al., Nat. Immunol. 2, 530-536 (2001); Kuwahara, K. et al. Blood 95, 2321-2328 (2000); 及び Denepoux, S. et al., Immunity 6, 35-46 (1997))。多くの B 細胞株にはトランスフェクションできなかったが、維持中は SHM を通常は生成しない AID を発現する Daudi B 細胞には $ganp$ 遺伝子を導入できた。このクローンは、野生型及び偽トランスフェクションした細胞と比較して高頻度の SHM ($5 \times 10^{-4}/bp$) を V-領域で示した。SHM は、定常領域遺伝子には誘導されなかった (図 8)。GANP の RNA プライマーゼ活性は S502 でのリン酸化により調節され、これは特異的モノクローナル抗体により検出できる (Kuwahara, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283 (2001))。インビトロ及びインビボでの B 細胞の刺激は共に S502 のリン酸化を誘導するので (Kuwahara, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10279-10283 (2001))、このリン酸化が Daudi B 細胞での SHM の生成に関与するかどうかを調べた。非リン酸化 GANP 変異体 (GANP-S502A) を導入した場合、SHM は誘発されなかったことから (図 8)、S502 のリン酸化が、GC-B 細胞での SHM の生成に重

要であることが示唆された。

2. B細胞でG A N Pを過剰発現させたトランスジェニックマウス

免疫応答におけるG A N Pの関与を調べるために、ヒトIgエンハンサー及びプロモーターの制御下のG A N P-トランスジェニック (Tg)マウスを作製した (図9のa及びb)。このマウスは、B細胞でG A N Pの発現の増加を示し (図9のc)、骨髄、脾臓及びリンパ節の細胞の表層マーカー分析によりB系細胞の通常の分化を示した。SHMにおけるG A N Pのインビボでの役割を調べるために、TD-Ag NP-CGでの免疫後におけるV_H186.2領域について調べた。V_H186.2ローカスは、高親和性IgG (γ1λ1) NP-応答について特有のパターンのSHMを示す。NP-CGでの免疫後における全脾臓B細胞の配列分析により、野生型マウスと比較してG A N P-TgマウスではSHMの頻度が僅かに増加していることが示された (図10)。このマウスは、33番目のWからLへのSHMの増加を示した (~3倍)。この変異は、ハプテン特異的B細胞の親和性成熟に重要であることが以前に示されている (Allen, D., et al., EMBO J. 1995-2001 (1988))。

3. B細胞特異的G A N P欠損マウス (B-KO) の作製

RNAプライマーゼG A N Pの役割を調べるために、Cre-loxPシステムを用いてCD19⁺B細胞をターゲットにしてG A N P遺伝子を欠失させたG A N P^{-/-}B-マウスを作製した (図11のa及びb)。floxed B細胞はG A N P mRNA (図11のc)を発現せず、また免疫染色によればタンパク質 (図11のd)をほとんど発現しない。G A N P^{-/-}B-マウスは正常に成育し、骨髄、脾臓、リンパ節で正常な数のリンパ細胞を示した。フローサイトメトリー分析では、骨髄、胸腺及び脾臓の細胞の表面マーカーについて正常の染色プロファイルを示した (図12)。リンパ節では、sIgM^{low}sIgD^{high}を発現する成熟B細胞の数が減少していた。G A N P^{-/-}B-マウス由来のB細胞は、インビトロで抗μ抗体、抗μ抗体+抗CD40モノクローナル抗体、またはリポ多糖による刺激後に通常の増殖応答を示した (図13)。血清

Ig 量は野生型と同様であった。

4. GANP^{-/-} B-マウスにおける抗原特異的抗体産生

TI-Ag 及び TD-Ag による免疫に対する GANP^{-/-} B-マウスの応答を調べた。免疫の 14 日後に、トリニトロフェニル(TNP)-Ficoll は GANP^{-/-} B-マウス及び野生型マウスにおいて同様の応答を誘導した(図 14)。TNP-keyhole limpet hemocyanin (KLH) 及び NP-CG などの TD-Ags に応答して、変異体マウスは野生型と比べて遅延した GC 形成を示した。GANP^{-/-} B-マウスは 10 日目まで明確な GC を示さなかったが、TNP-KLH による免疫後の 14 日目に GC の段階的な増加と拡大を示した(図 15)。GC 形成のピーク応答は野生型と比較して遅延しており、野生型は、10 日目に GC-B 細胞のマーカーであるピーナツアグルチニンで染色された大きな成熟した GC を示した。GANP^{-/-} B-マウスは 14 日目に GC の明白な形成を示したので、抗原特異的抗体応答を測定した(図 16)。変異体マウスは TNP-KLH に対して同様の抗体応答を示した。

5. GANP^{-/-} B-マウスにおける親和性成熟の障害

GANP^{-/-} B-マウスにおける GC の特徴をさらに調べるために、抗原特異的 IgG1 GC-B 細胞を NP-CG による免疫後に調べた。図 17 に示す通り、NP-特異的 IgG1^{high}CD38^{low} B 細胞は GANP^{-/-} B-マウスでは著しく減少した。対照的に、IgG1^{high}CD38^{high} メモリー B 細胞は減少しなかった。これらの結果は、GANP の空の変異は IgG1^{high}CD38^{low} GC-B 細胞段階で B 細胞の分化に欠陥を生じさせていることを示す。SHM は B 細胞分化のこの段階で生じるため、V_H186.2 ローカスの SHM について各種の精製した B 細胞を調べた。V_H186.2 ローカスは、高親和性 IgG (γ1_H1) NP-応答のために利用されている。IgM ローカスは野生型と比較して差異がなかった。そこで、Ag-結合 IgG1 B 細胞を図 17 に示す通り精製し、V_H186.2 の配列を比較した(図 18)。GANP^{-/-} B-マウスの IgV-領域配列の全体の変異は野生型と同様であったが、W33 から L への高親和性型の変異 (C57BL/6 マウスで

顕著に見られる) は、変異型マウスでは顕著に減少していた。

6. まとめ

GANP^{-/-} B-マウス及びGANP-Tg マウスの結果は、GANPがTD-Ag による免疫後における高親和性B細胞の生成に関与していることを実証している。GANPの役割としては、GC-B細胞でDNAポリメラーゼの効率的なリクルートと調節を仲介している可能性がある。V-領域SHMを有するGC-B細胞が高親和性BCRを取得すると、それらは選択されるべきであり、そしてさらにB細胞のV領域のSHMは抑制されて、インビボで高親和性抗体の産生が保証されるはずである。GC-B細胞でのAIDの発現はDNA変異を絶えず生成する可能性があるため、AID活性の調節がB細胞での高親和性BCRを維持するために必要であるかもしれない。GANP^{-/-} B-マウスでの結果から、GANPがSHMプロセスに必要であることが示される。

実施例3：GANPトランスジェニックマウスを用いた高親和性抗体の産生

野生型(WT)マウスとGANPトランスジェニック(Tg)マウスの2匹づつにNP-CG 100 μ gを免疫し、28日後の血清を取り、ELISAを行った。20 μ g/mlのNP2-BSAとNP17-BSAをELISAプレートに4℃で1晩コーティングした。3%BSA/PBS-0.1%Tween20で1時間ブロックし、血清を1時間反応させた。PBS-0.1%Tween20で3回洗い、ビオチン標識抗マウスIgG1抗体(Southern Biotechnology)で1時間反応させた。PBS-0.1%Tween20で3回洗い、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン(Southern Biotechnology)で30分反応させた。PBS-0.1%Tween20で3回、TBSで1回洗い、p-Nitrophenyl phosphateを基質として発色させた。吸光度を405nmで測定した。結果を図19に示す。図19の結果から、GANPトランスジェニックマウスを使用することにより高親和性抗体が産生されることが分かる。



産業上の利用の可能性

本発明によるGANPを過剰発現したマウスを用いることによって、従来では得られることのできなかったウイルス抗原に特異的で高親和性の抗体を速やかに作成することができる。そのため、エイズやC型肝炎のように遷延する感染による病状悪化を当該のウイルス抗原の変異に遅れないで特異的で強力な抗体を速やかに得ることが可能となると期待される。また、これによって、感染患者からのウイルスの抗原の変異に対応するオーダーメイドの特異的抗体を作成することができる。モノクローナル抗体の作成に必要な免疫期間は10日程度で十分であり、そのうち高親和性の変異を持つ抗体の産生効率は60%近くに上る。ベッドサイドの患者サンプルを用いる高親和性抗体の産生プロトコールはワクチン療法に変わる新しい免疫療法となると期待される。

請求の範囲

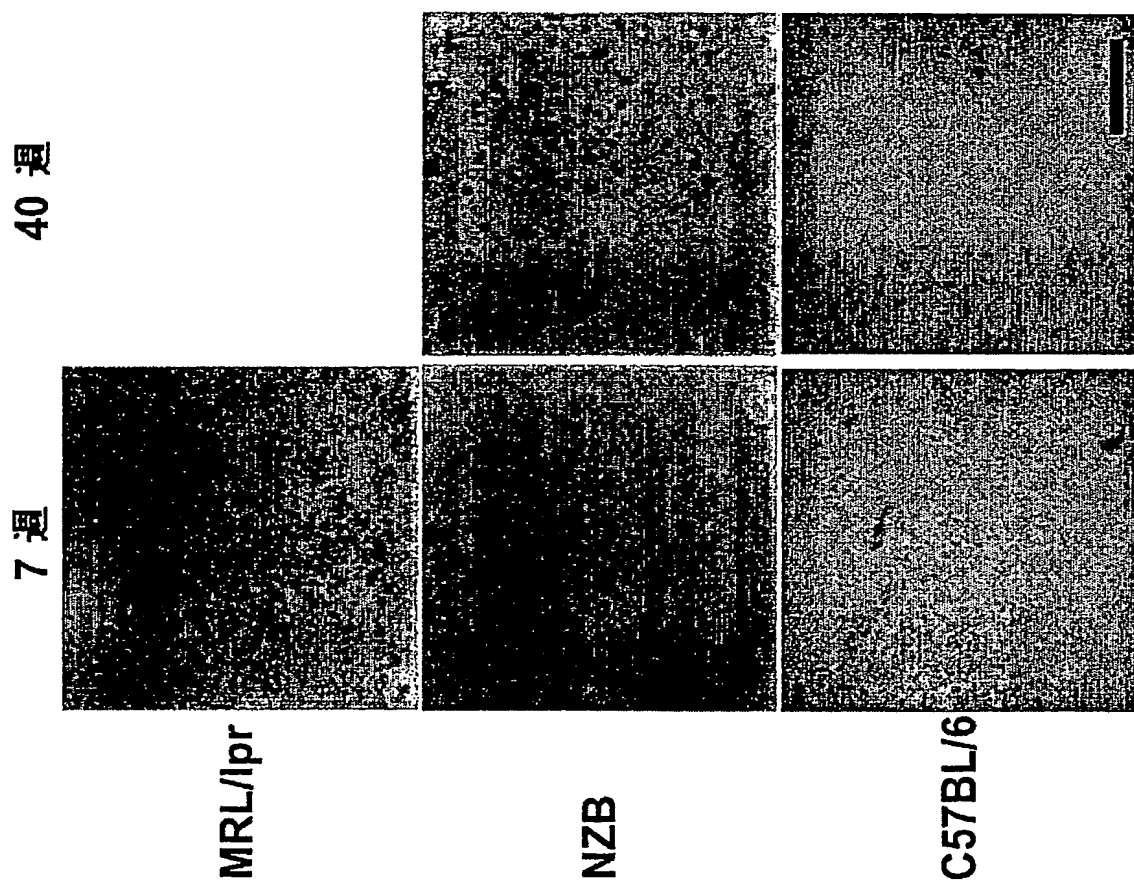
1. GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部。
2. 導入したGANP遺伝子をB細胞で発現する、請求項1に記載のトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部。
3. GANP遺伝子をトランスフェクションしたES細胞から発生させた、請求項1又は2に記載のトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部。
4. 請求項1から3の何れかに記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫に抗原を投与して抗体を産生する、高親和性抗体の産生方法。
5. 請求項4に記載方法により産生される高親和性抗体又はその断片。
6. 請求項5に記載の高親和性抗体又はその断片を含有する、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤。
7. 請求項5に記載の抗体のV領域を含むヒト型抗体又はその断片。
8. 請求項7に記載のヒト型抗体又はその断片を含む薬剤。
9. 抗原を投与した請求項1から3の何れかに記載のトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

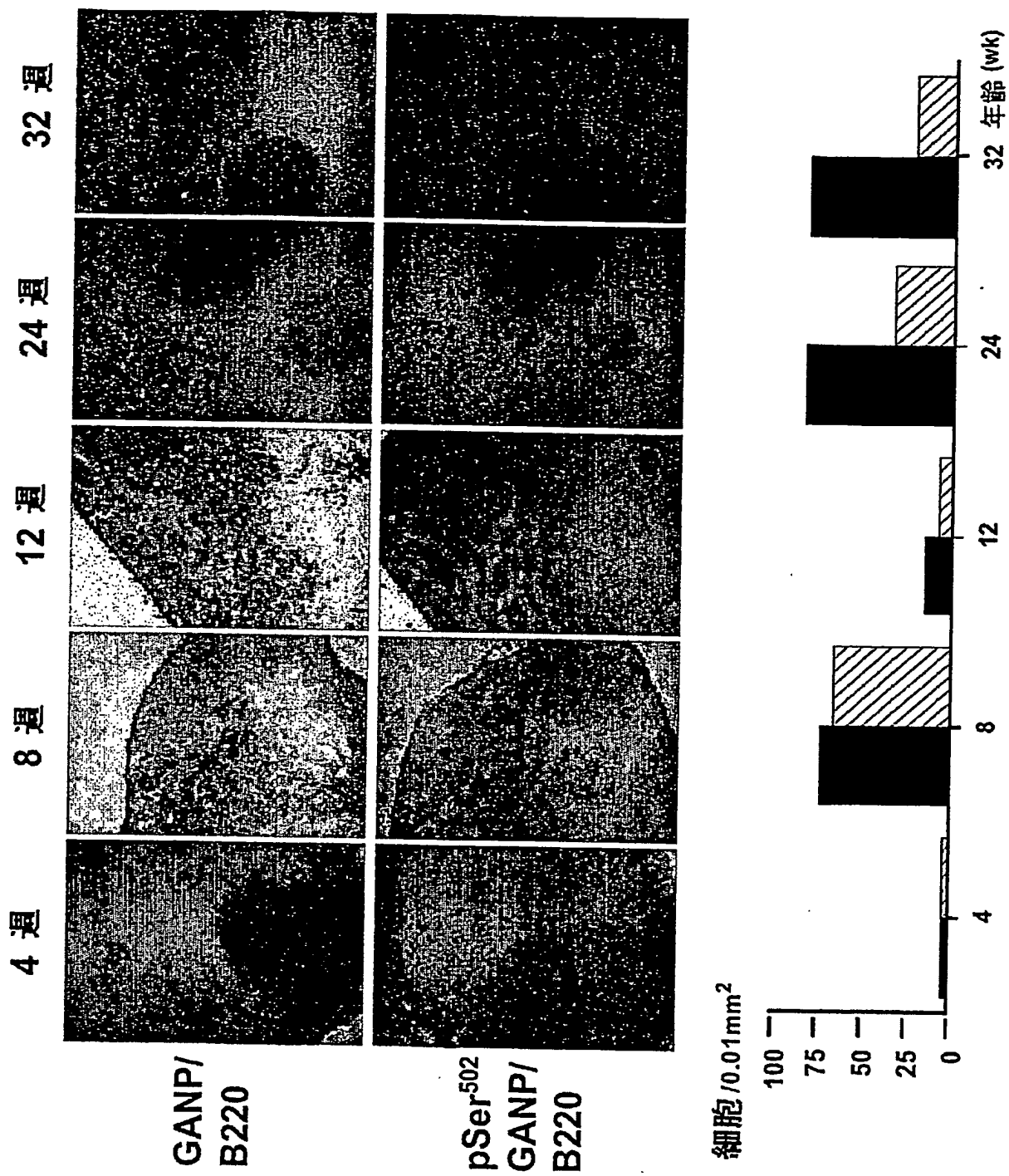
要約書

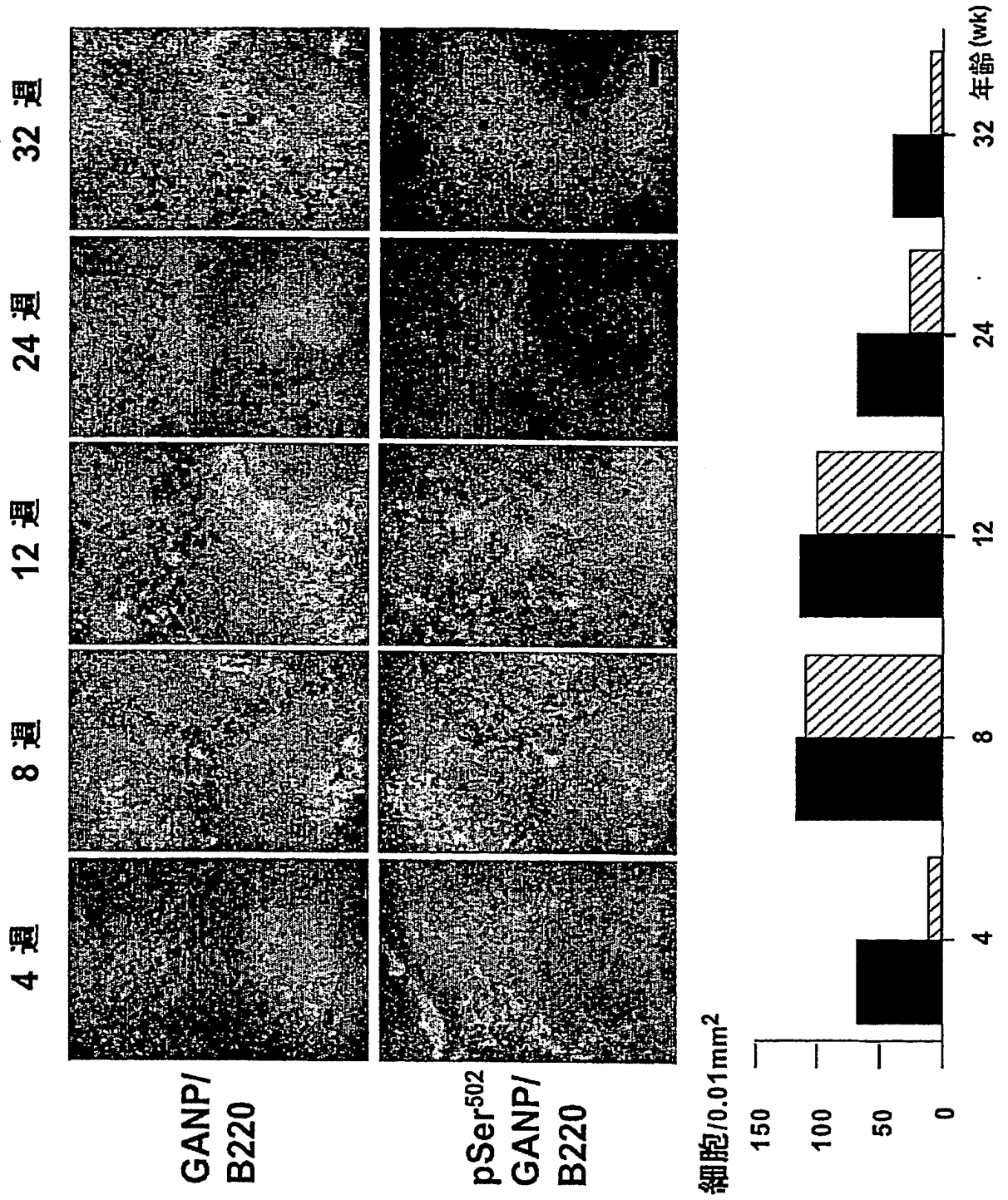
本発明の目的は、各種疾患の診断薬及び治療薬として有効な高親和性抗体、当該抗体を産生するためのトランスジェニック哺乳動物、該高親和性抗体又は高親和性抗体産生細胞を用いた薬剤を提供することである。本発明によれば、GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物、その子孫又はそれらの一部、並びにそれを用いた高親和性抗体の産生方法が提供される。

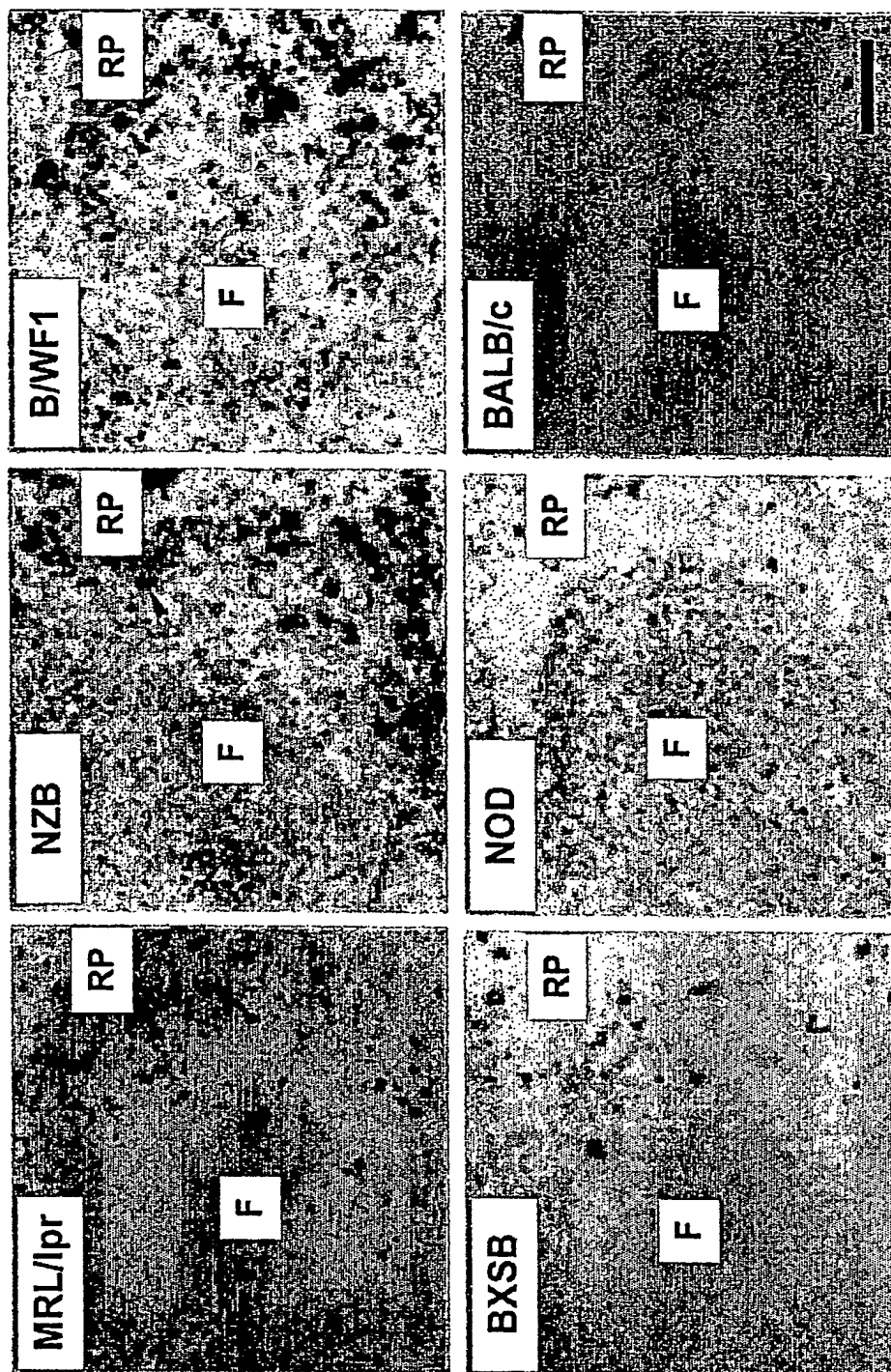


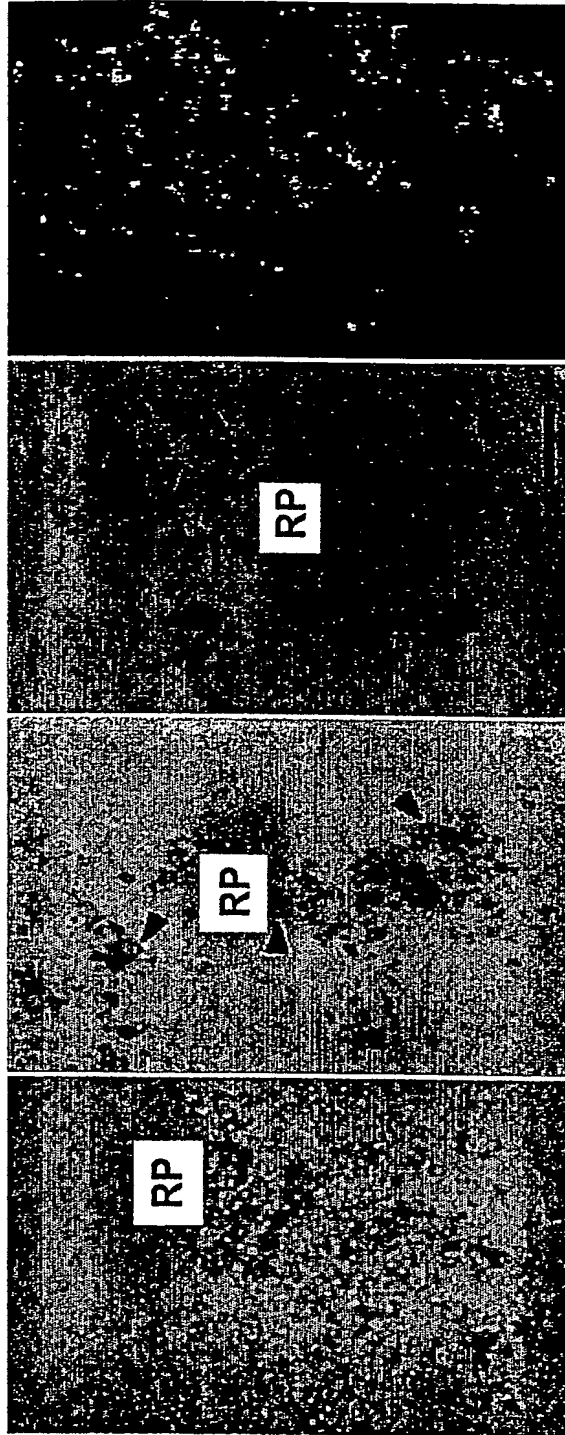
図 1









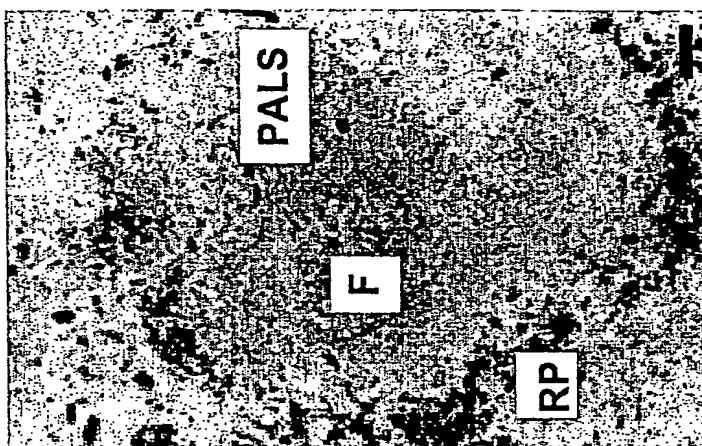


GANP/IgG

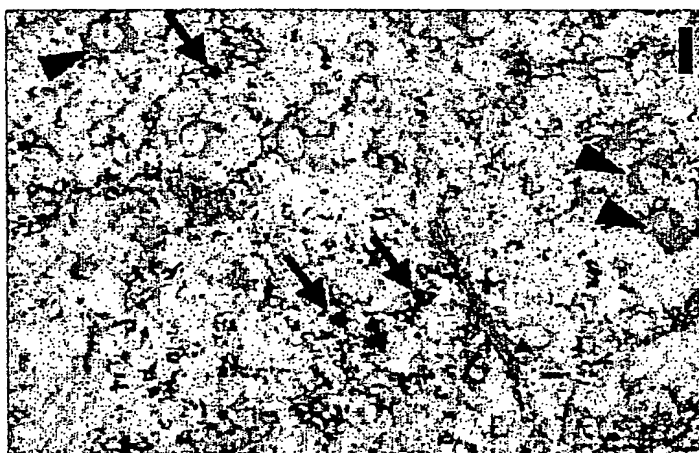
GANP/IgM

GANP/Syndecan-1

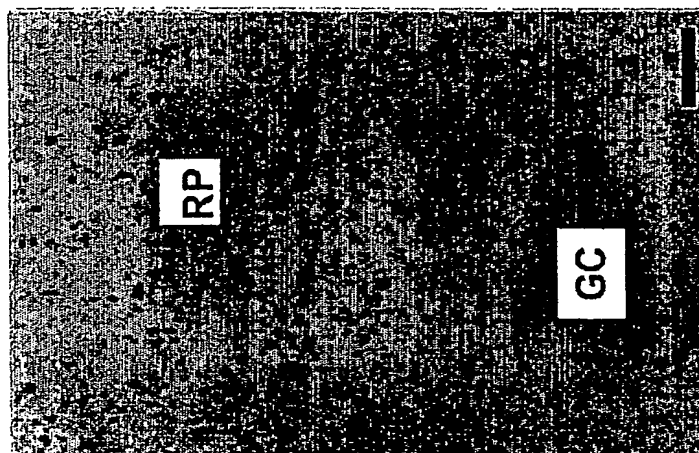
GANP/B220



GANP/CD5

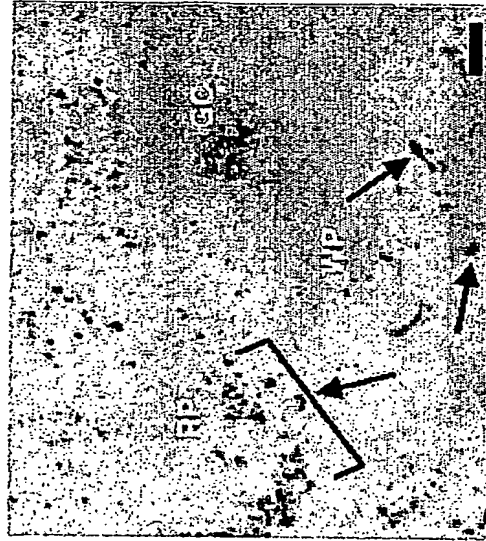


GANP/PAS



GANP/BrdU

TNP-KLH



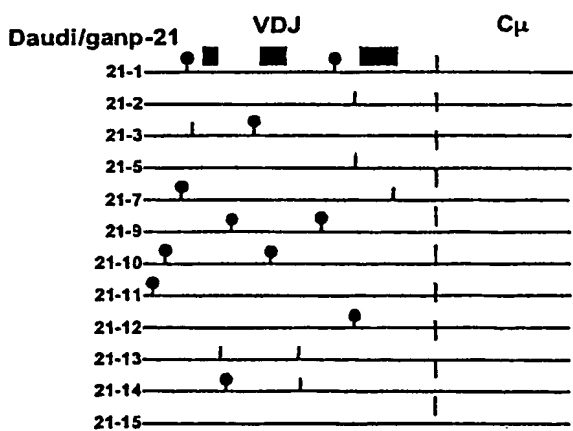
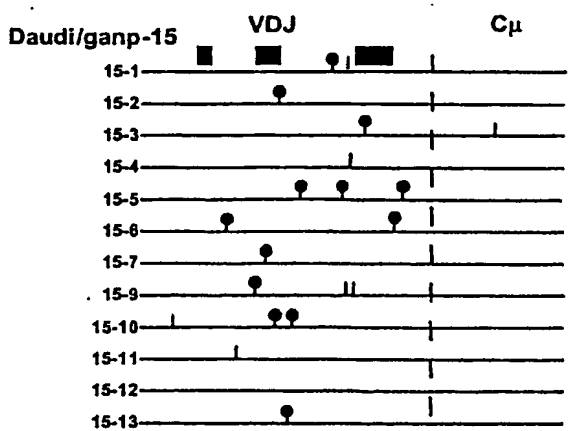
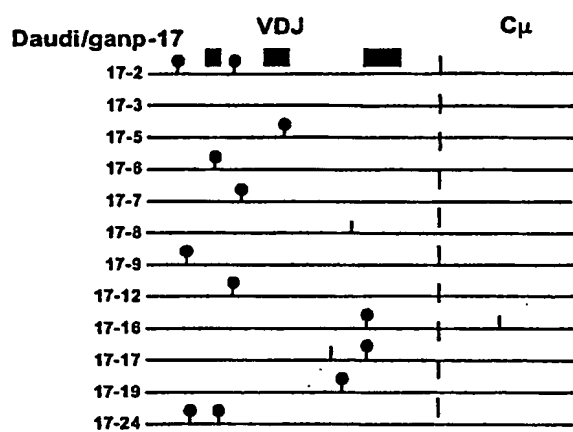
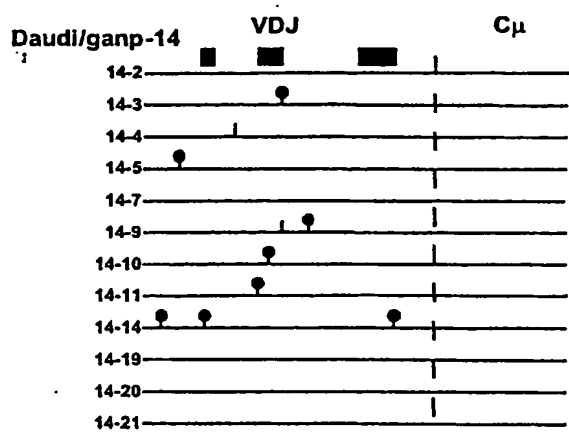
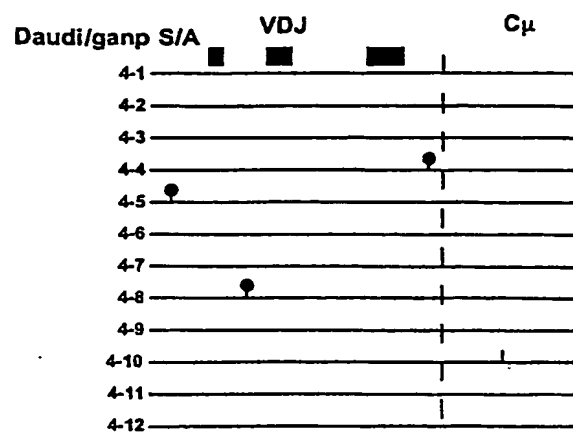
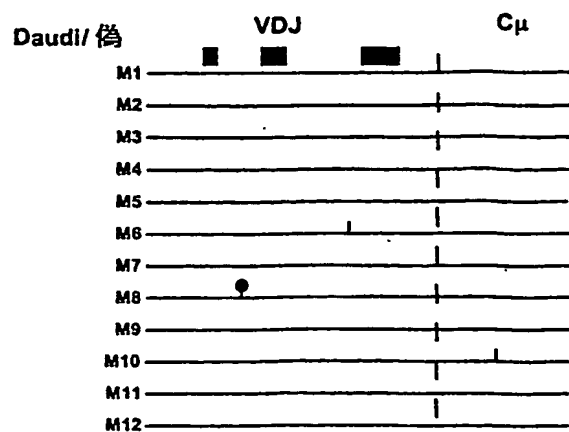
GANP

TNP-FicolII

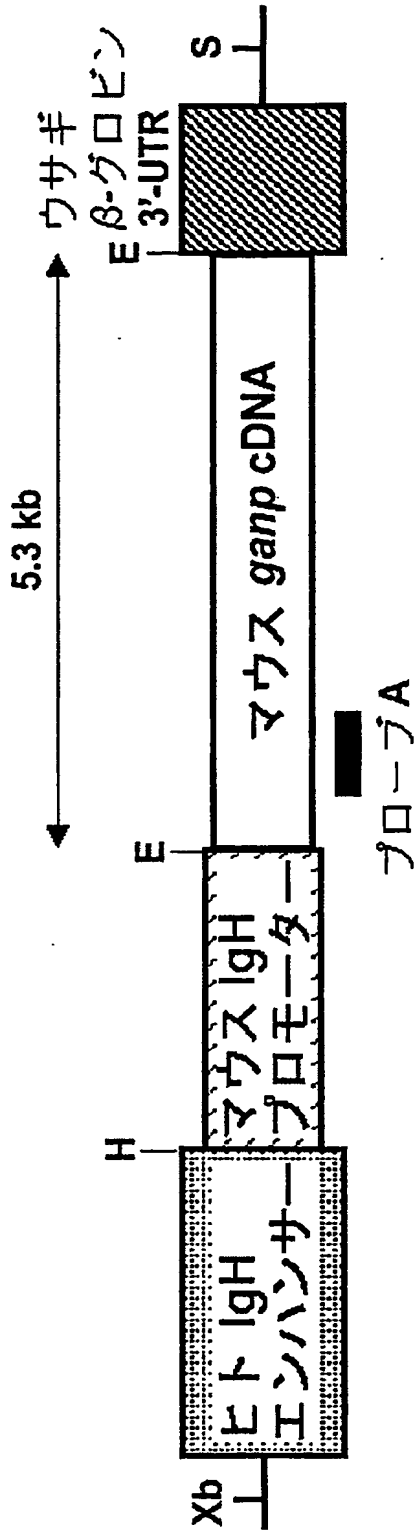


GANP/IgD

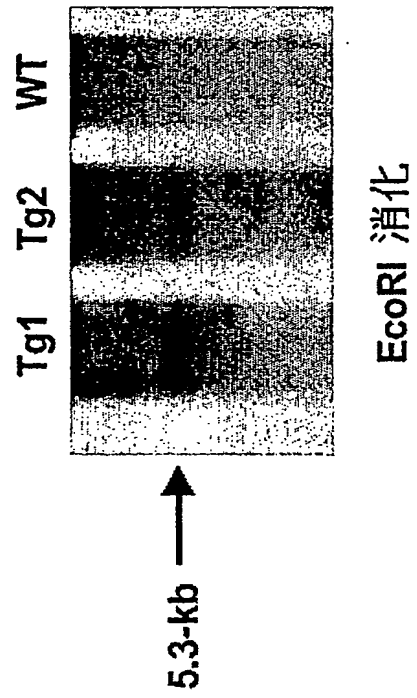
图 8



a



b



c

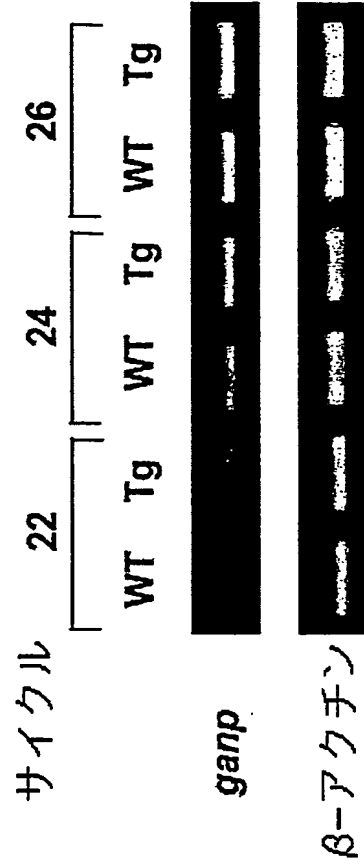


图 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16¹ 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
Q V Q L Q Q Q P G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T P T
CAG GTC CAA CTG CAG CAG OCT GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG CTG TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACC

WM-4

WT-5

17-6-14

WT-9-----T-----A-----T-----S

WT-10

100-11-1

PT-14

07-16---

W-17

WT-18

WT-19---

W-20

WT

図 10 の続き 1

CDR2

CDR1

[illegible]

図 10 の続き 2

[illegible]

図 10 の続き 3

[illegible]

१७

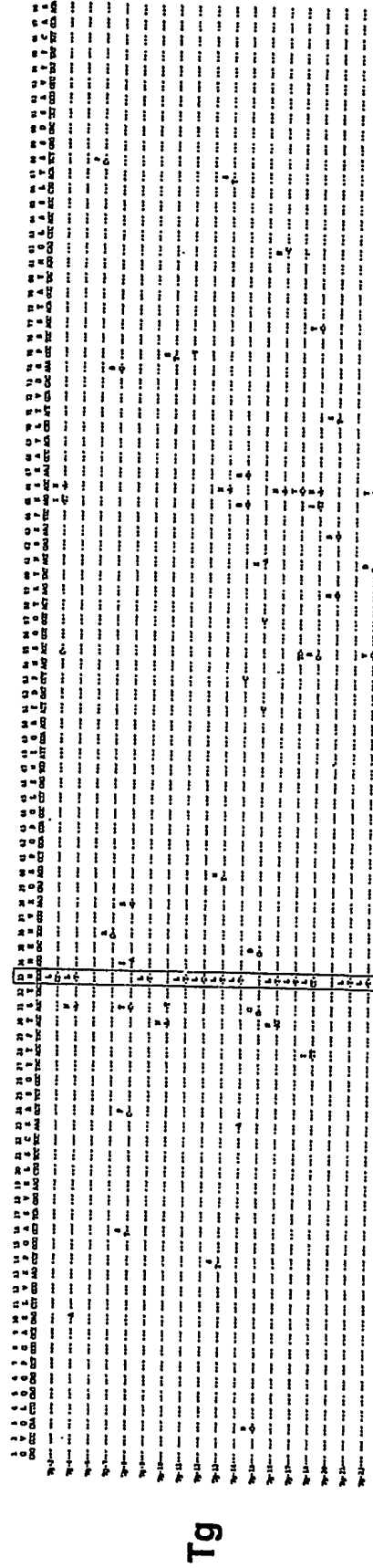
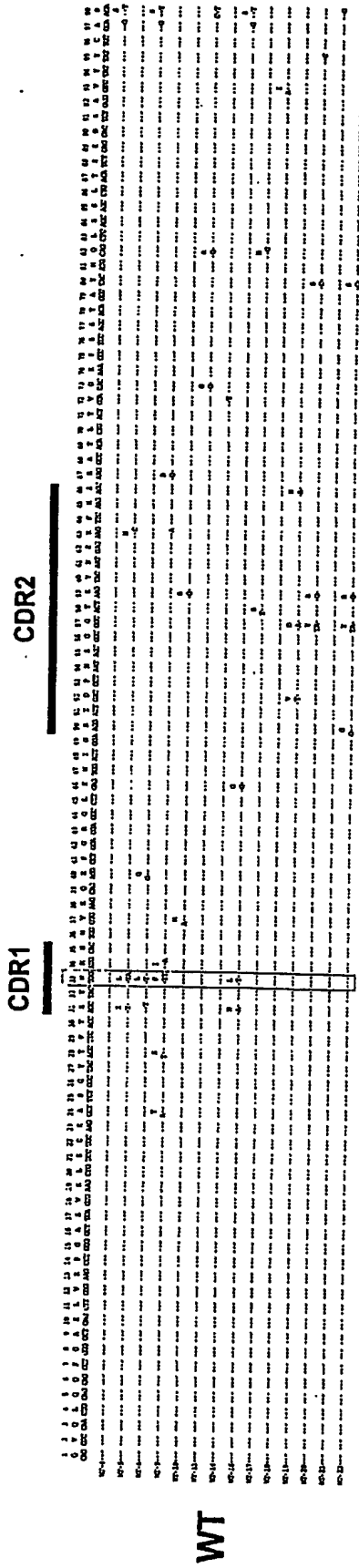
図 10 の続き 4

31	S	ACC	TAC	L	CTG	ATG	CAC	TGG	GAG	AGG	CCT	GGA	GGA	GCC	CCT	GAG	TGG	ATT	GGA	AGG	ATT	GAT	CCT	ANT	AGT	GGT	GGT	ACT	AGG	TAC	ANT	GAG	AGG	TTC	AGG	AGC	I	N	-TT	-A-
32	S	Y	TGG	L	CTG	ATG	CAC	TGG	GAG	AGG	CCT	GGA	GGA	GCC	CCT	GAG	TGG	ATT	GGA	AGG	ATT	GAT	CCT	ANT	AGT	GGT	GGT	ACT	AGG	TAC	ANT	GAG	AGG	TTC	AGG	AGC	I	N	-TT	-A-
33	S	Y	TGG	L	CTG	ATG	CAC	TGG	GAG	AGG	CCT	GGA	GGA	GCC	CCT	GAG	TGG	ATT	GGA	AGG	ATT	GAT	CCT	ANT	AGT	GGT	GGT	ACT	AGG	TAC	ANT	GAG	AGG	TTC	AGG	AGC	I	N	-TT	-A-
34	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
35	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
36	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
37	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
38	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
39	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
40	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
41	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
42	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
43	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
44	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
45	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
46	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
47	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	-A-
48	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	R	G	R	G	L	E	W	I	G	R	I	P	D	P	N	S	G	G	T	K	Y	N	E	K	F	K	S	I	N	-TT	

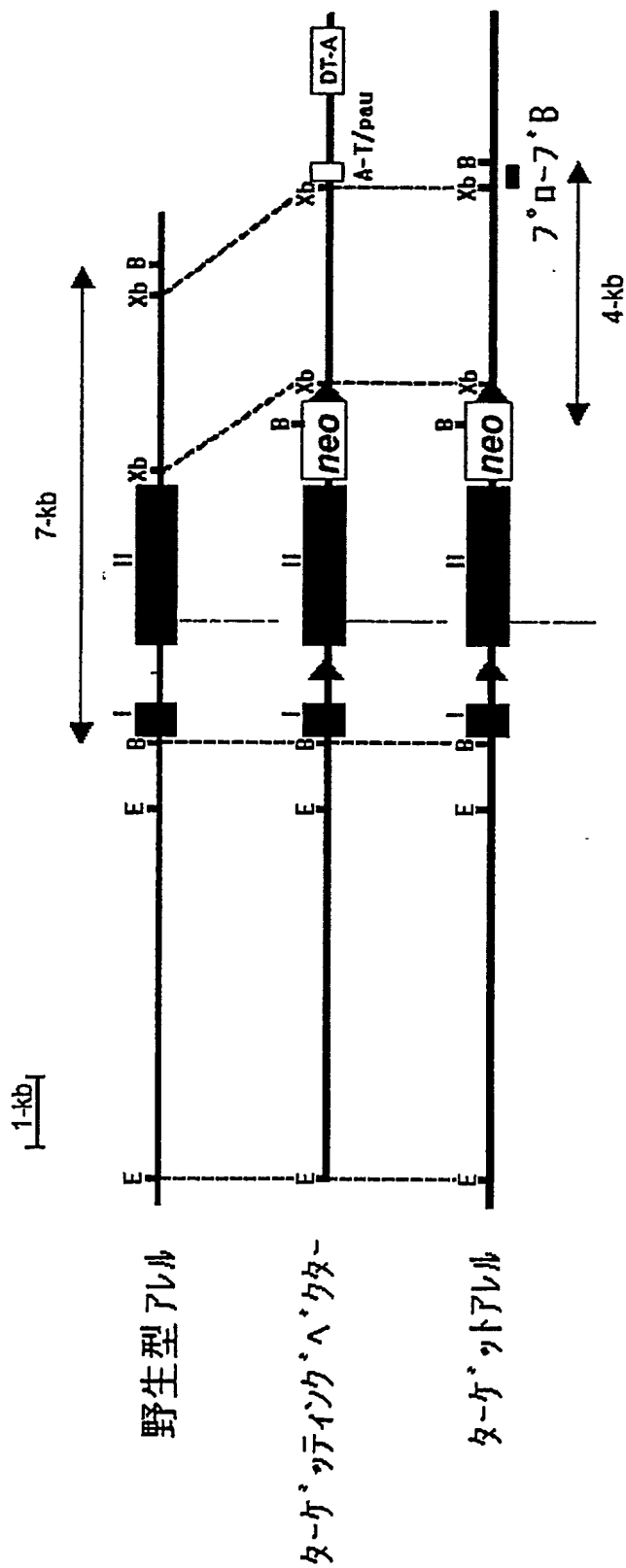
図 10 の続き 5

67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98
K A T L T V D K P S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R
APG GCC ACA CTG ACT GTA GAC AAA CCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAT TGT GCA ACA

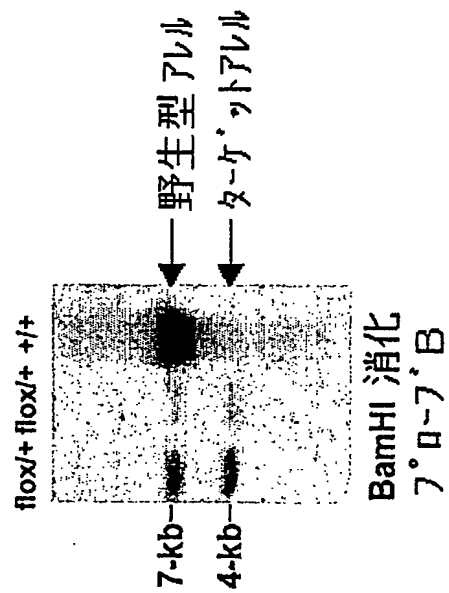
b



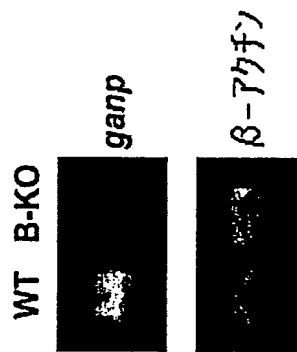
a



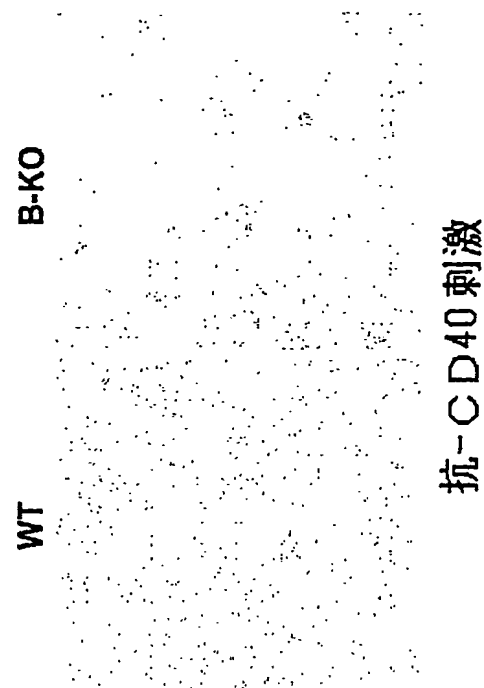
b



c



d



e

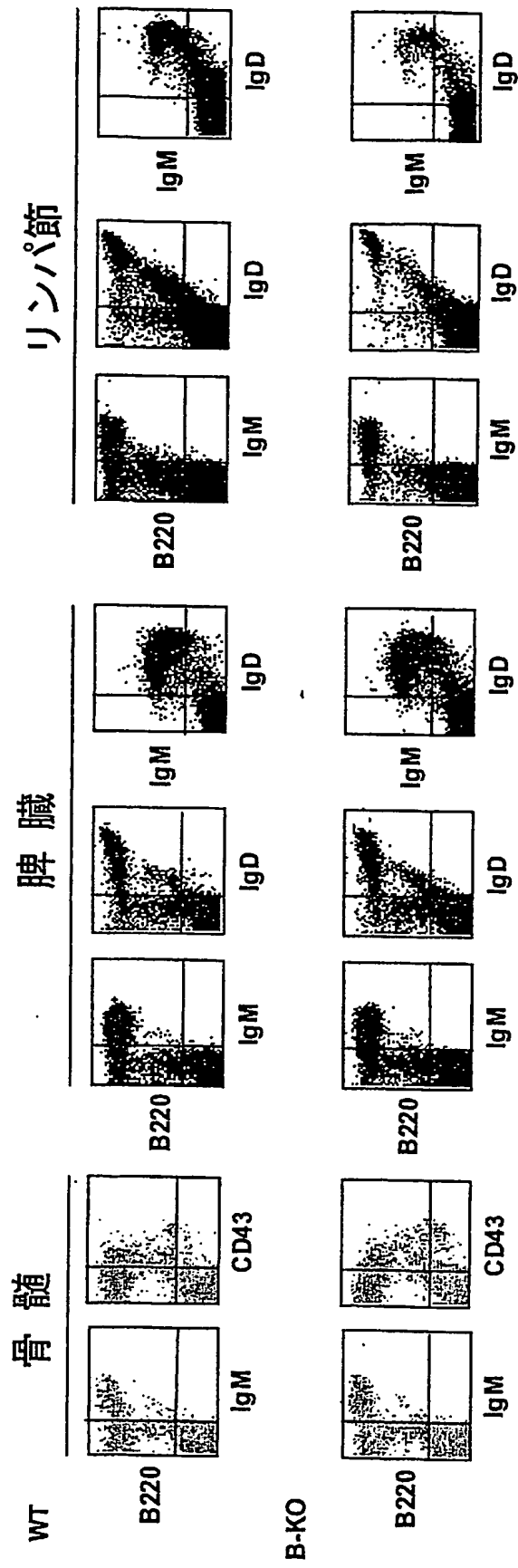
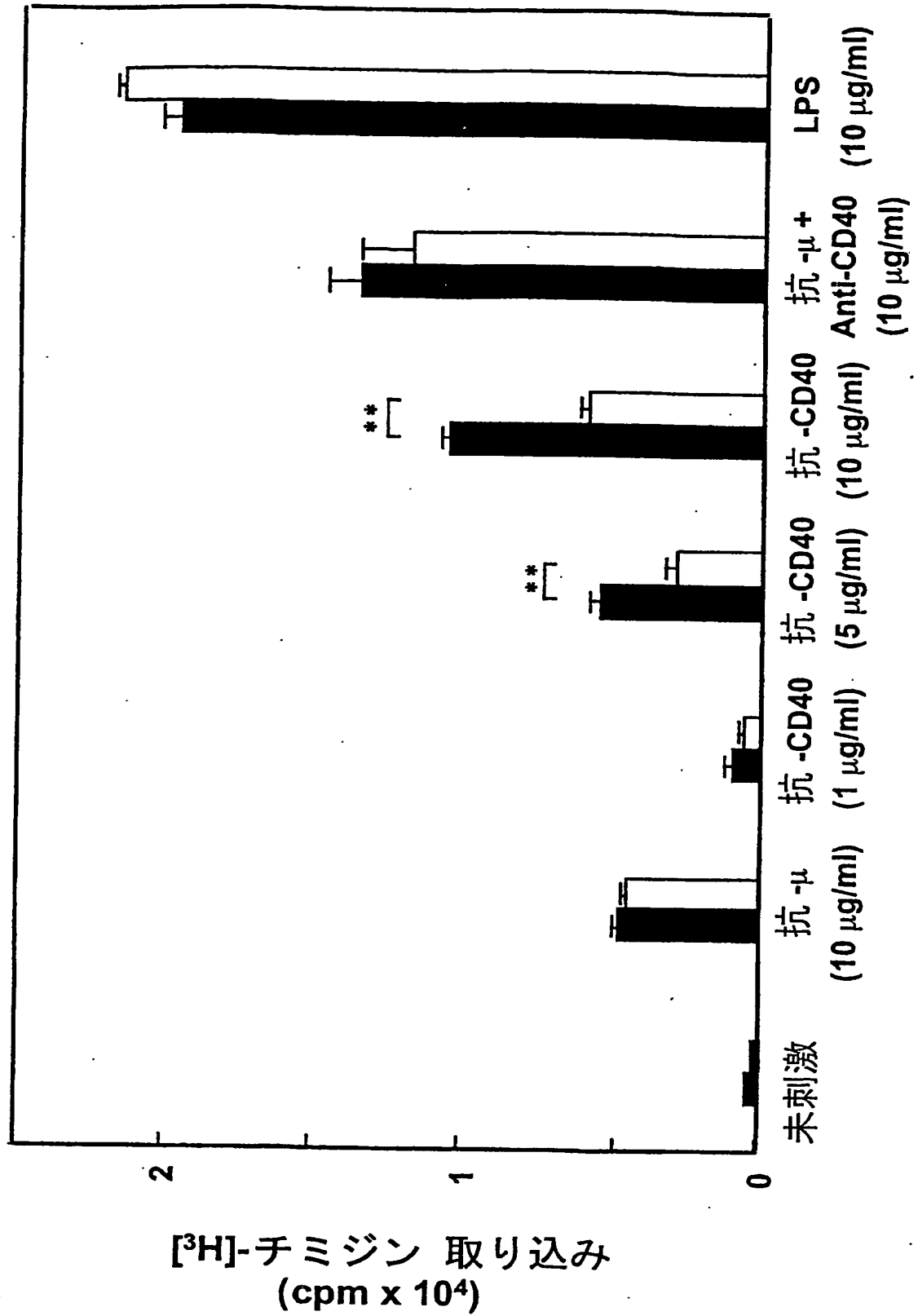


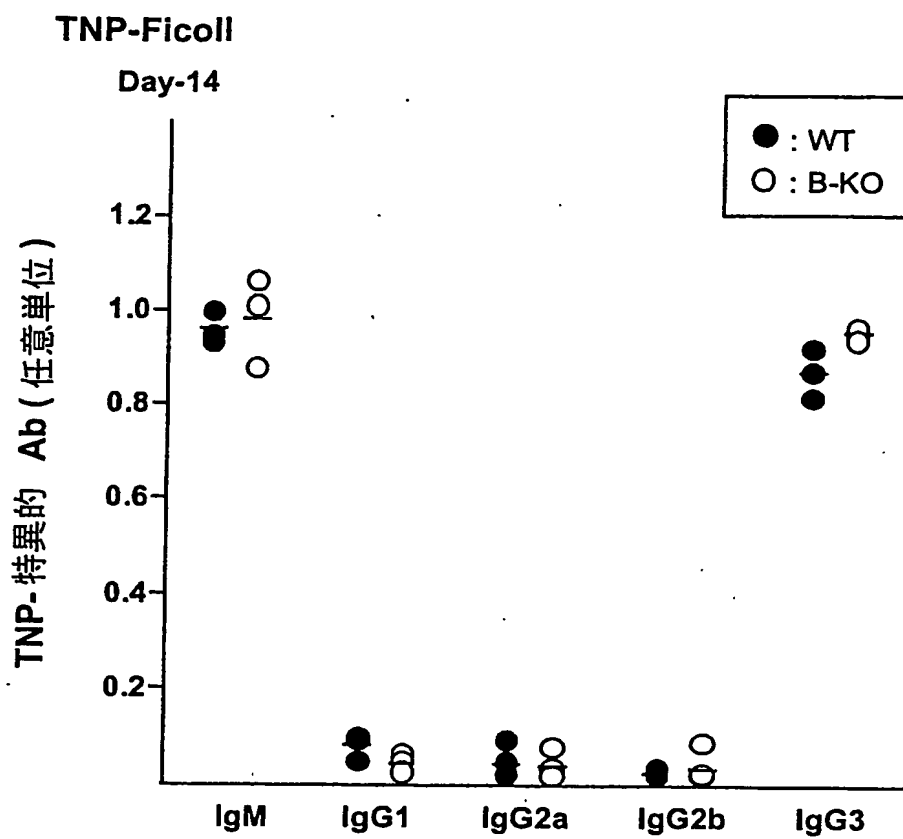
図 13



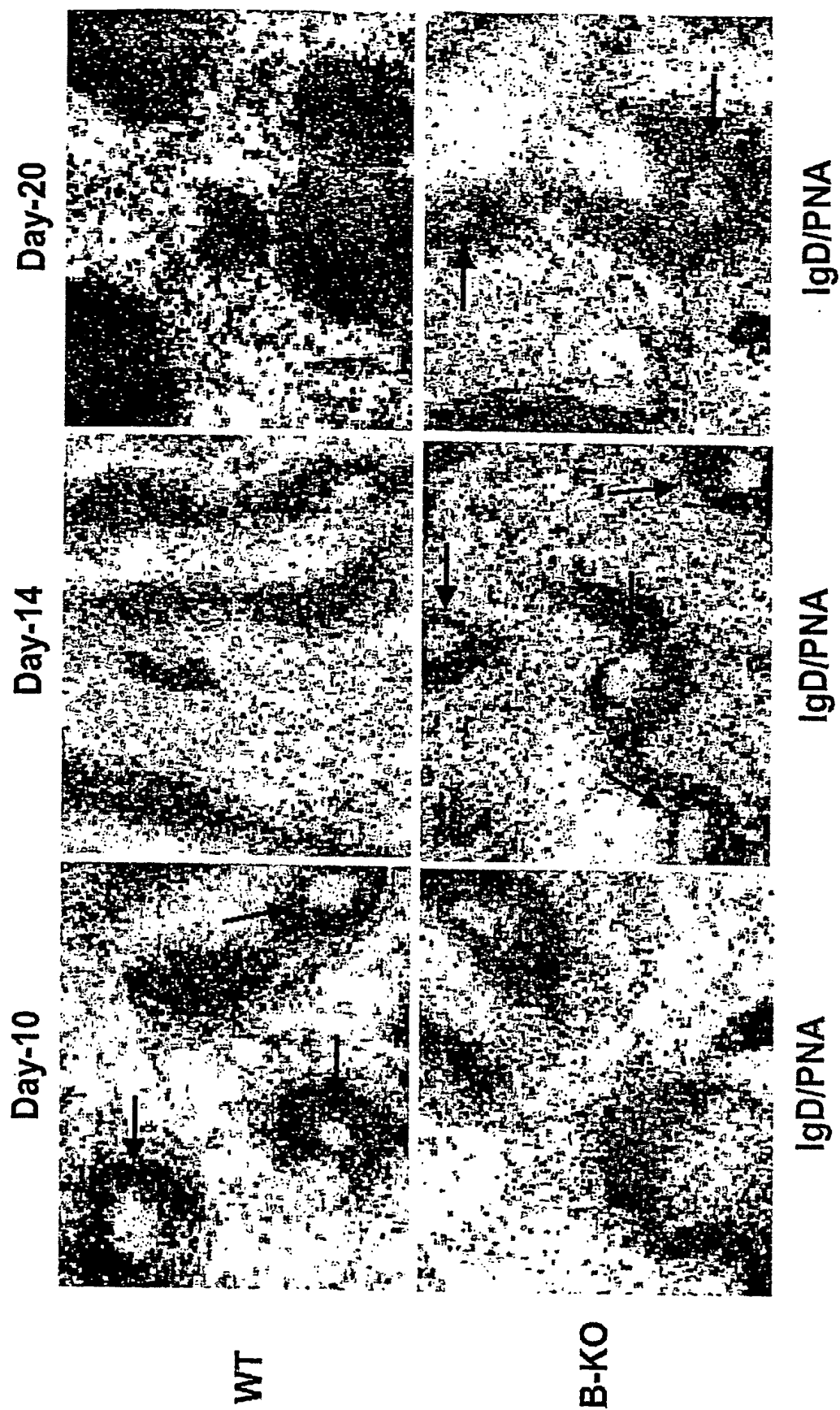
f

図 14

a



b



c

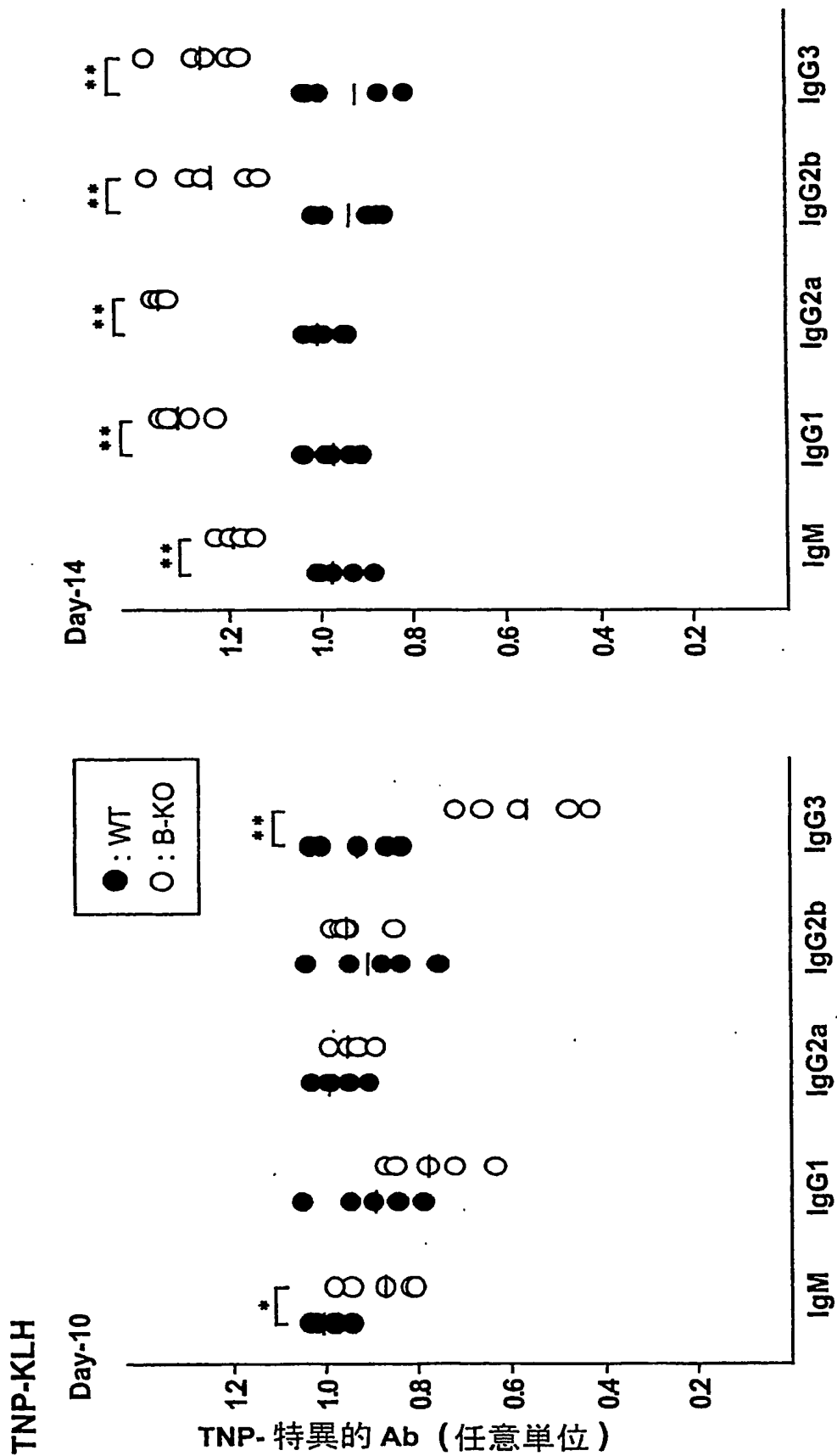
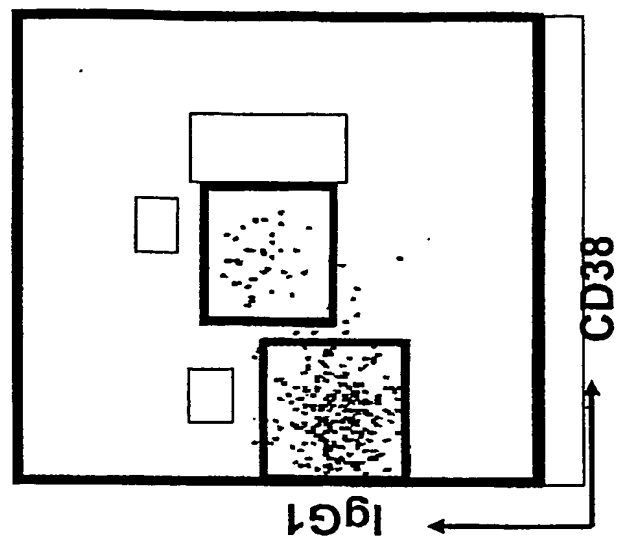
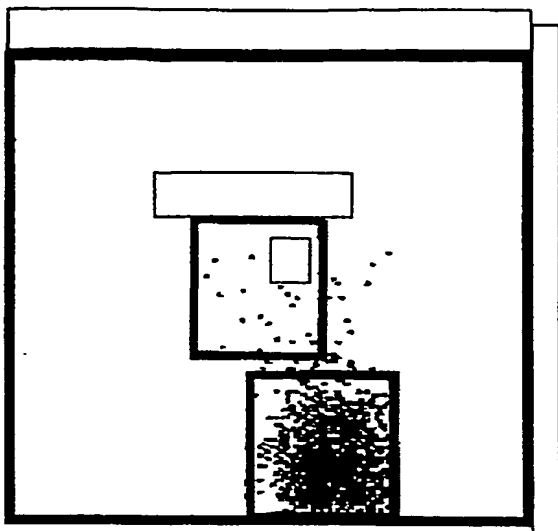


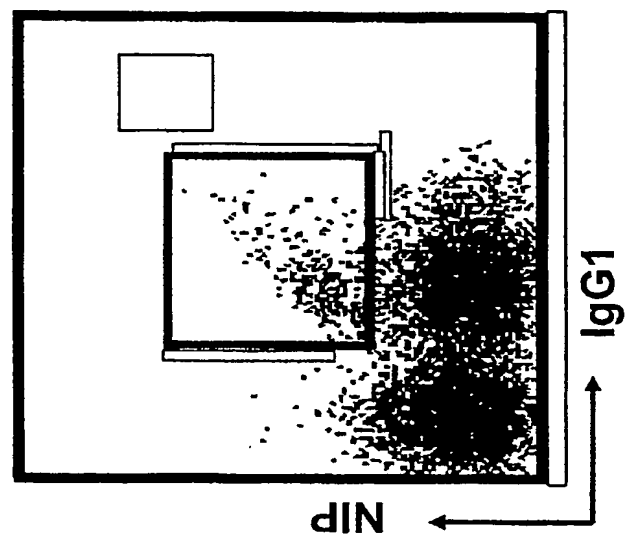
図 17

a

WT
NP-CG
Day14



B-KO
NP-CG
Day14



18

b

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	P	T
CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GIG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GIG	AAG	CIG	TCC	TCC	AAG	GCT	TCT	GCC	TAC	ACC	TTC	ACC
1-5																	I								A				
1-6																													
3-1																													
3-2																													
3-3																													
4-2																													
4-4																													
4-6																													
1-7																													
1-8																													
1-10																													
4-7																													
4-9																													
6-1																													
6-2																													

WT

図 18 の続き 1

CDR2

[illegible]

図 18 の続き 2

[illegible]

図 18 の続き 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		
Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S		
QAG	GTC	CAA	CTG	QAG	QAG	QCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GIG	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GIG	AAG	CTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACC	TTC	ACC	AGC		
1-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	I	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---		
1-5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C	---	---	---	---	---	---	
1-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
2-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	N	
2-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	N
4-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	N
8-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8-2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

B-KO

31	S	ACC	TAC	32	W	ATG	CAC	33	W	ATG	CAC	34	ATG	CAC	35	W	ATG	CAC	36	W	ATG	CAC	37	W	ATG	CAC	38	W	ATG	CAC	39	W	ATG	CAC	40	W	ATG	CAC	41	W	ATG	CAC	42	W	ATG	CAC	43	W	ATG	CAC	44	W	ATG	CAC	45	W	ATG	CAC	46	W	ATG	CAC	47	W	ATG	CAC	48	W	ATG	CAC	49	W	ATG	CAC	50	W	ATG	CAC	51	W	ATG	CAC	52	W	ATG	CAC	53	W	ATG	CAC	54	W	ATG	CAC	55	W	ATG	CAC	56	W	ATG	CAC	57	W	ATG	CAC	58	W	ATG	CAC	59	W	ATG	CAC	60	W	ATG	CAC	61	W	ATG	CAC	62	W	ATG	CAC	63	W	ATG	CAC	64	W	ATG	CAC	65	W	ATG	CAC	66	W	ATG	CAC	67	W	ATG	CAC	68	W	ATG	CAC	69	W	ATG	CAC	70	W	ATG	CAC	71	W	ATG	CAC	72	W	ATG	CAC	73	W	ATG	CAC	74	W	ATG	CAC	75	W	ATG	CAC	76	W	ATG	CAC	77	W	ATG	CAC	78	W	ATG	CAC	79	W	ATG	CAC	80	W	ATG	CAC	81	W	ATG	CAC	82	W	ATG	CAC	83	W	ATG	CAC	84	W	ATG	CAC	85	W	ATG	CAC	86	W	ATG	CAC	87	W	ATG	CAC	88	W	ATG	CAC	89	W	ATG	CAC	90	W	ATG	CAC	91	W	ATG	CAC	92	W	ATG	CAC	93	W	ATG	CAC	94	W	ATG	CAC	95	W	ATG	CAC	96	W	ATG	CAC	97	W	ATG	CAC	98	W	ATG	CAC	99	W	ATG	CAC	100	W	ATG	CAC	101	W	ATG	CAC	102	W	ATG	CAC	103	W	ATG	CAC	104	W	ATG	CAC	105	W	ATG	CAC	106	W	ATG	CAC	107	W	ATG	CAC	108	W	ATG	CAC	109	W	ATG	CAC	110	W	ATG	CAC	111	W	ATG	CAC	112	W	ATG	CAC	113	W	ATG	CAC	114	W	ATG	CAC	115	W	ATG	CAC	116	W	ATG	CAC	117	W	ATG	CAC	118	W	ATG	CAC	119	W	ATG	CAC	120	W	ATG	CAC	121	W	ATG	CAC	122	W	ATG	CAC	123	W	ATG	CAC	124	W	ATG	CAC	125	W	ATG	CAC	126	W	ATG	CAC	127	W	ATG	CAC	128	W	ATG	CAC	129	W	ATG	CAC	130	W	ATG	CAC	131	W	ATG	CAC	132	W	ATG	CAC	133	W	ATG	CAC	134	W	ATG	CAC	135	W	ATG	CAC	136	W	ATG	CAC	137	W	ATG	CAC	138	W	ATG	CAC	139	W	ATG	CAC	140	W	ATG	CAC	141	W	ATG	CAC	142	W	ATG	CAC	143	W	ATG	CAC	144	W	ATG	CAC	145	W	ATG	CAC	146	W	ATG	CAC	147	W	ATG	CAC	148	W	ATG	CAC	149	W	ATG	CAC	150	W	ATG	CAC	151	W	ATG	CAC	152	W	ATG	CAC	153	W	ATG	CAC	154	W	ATG	CAC	155	W	ATG	CAC	156	W	ATG	CAC	157	W	ATG	CAC	158	W	ATG	CAC	159	W	ATG	CAC	160	W	ATG	CAC	161	W	ATG	CAC	162	W	ATG	CAC	163	W	ATG	CAC	164	W	ATG	CAC	165	W	ATG	CAC	166	W	ATG	CAC	167	W	ATG	CAC	168	W	ATG	CAC	169	W	ATG	CAC	170	W	ATG	CAC	171	W	ATG	CAC	172	W	ATG	CAC	173	W	ATG	CAC	174	W	ATG	CAC	175	W	ATG	CAC	176	W	ATG	CAC	177	W	ATG	CAC	178	W	ATG	CAC	179	W	ATG	CAC	180	W	ATG	CAC	181	W	ATG	CAC	182	W	ATG	CAC	183	W	ATG	CAC	184	W	ATG	CAC	185</
----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	-------

図 18 の続き 5

67	K	AAG	GCT	ACA	CTG	ACT	GTA	GAC	AAA	CCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAT	TGT	GCA	AGA
68	A	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R		
69	A	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R		
70	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R			
71	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R			
72	T	L	T	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R			
73	V	D	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R						
74	K	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R								
75	P	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R									
76	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R										
77	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R										
78	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R												
79	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R													
80	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R														
81	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R															
82	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																
83	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																	
84	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																		
85	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																			
86	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																				
87	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																					
88	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																						
89	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																							
90	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R																								
91	S	A	V	Y	Y	C	A	R																									
92	A	V	Y	Y	C	A	R																										
93	V	Y	Y	C	A	R																											
94	Y	Y	C	A	R																												
95	Y	Y	C	A	R																												
96	C	A	R																														
97	A	R																															
98	R																																

৯

WT

CDR1

CDR2

Figure 1 consists of 12 subplots, labeled (a) through (l), arranged in a 6x2 grid. Each subplot shows the dependence of a specific parameter on the parameter α , which ranges from 0 to 1. The subplots are organized as follows:

- Row 1 (a, g):** Shows the dependence of γ on α . The y-axis for (a) ranges from 0 to 1, and for (g) from 0 to 1.5.
- Row 2 (b, h):** Shows the dependence of β on α . The y-axis for (b) ranges from 0 to 1, and for (h) from 0 to 1.5.
- Row 3 (c, i):** Shows the dependence of δ on α . The y-axis for (c) ranges from 0 to 1, and for (i) from 0 to 1.5.
- Row 4 (d, j):** Shows the dependence of ϵ on α . The y-axis for (d) ranges from 0 to 1, and for (j) from 0 to 1.5.
- Row 5 (e, k):** Shows the dependence of ζ on α . The y-axis for (e) ranges from 0 to 1, and for (k) from 0 to 1.5.
- Row 6 (f, l):** Shows the dependence of η on α . The y-axis for (f) ranges from 0 to 1, and for (l) from 0 to 1.5.

The subplots exhibit various behaviors as α increases:

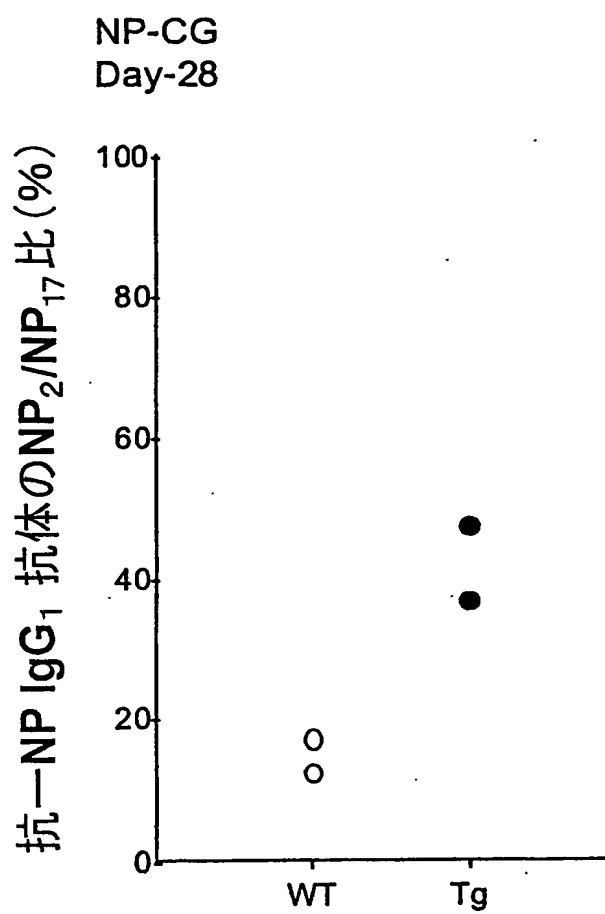
- (a) γ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (b) β :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (c) δ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (d) ϵ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (e) ζ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (f) η :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 0.8 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (g) γ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (h) β :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (i) δ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (j) ϵ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (k) ζ :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.
- (l) η :** Starts at 0, increases to a peak of approximately 1.2 at $\alpha \approx 0.4$, and then decreases to 0 at $\alpha = 1$.

B-KO

18/19

[illegible]

図 19



SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology and Industry Fundation

<120> A GANP-introduced transgenic mammal and use thereof

<130> A21666A

<160> 6

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ctataaccat ggaccatgga catactttgt tcc 33

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tgcatgcatt ctagagttgc cgttgggggtg ctggac 36

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tcccgccttc cagctgtgac 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gtgctgctgt gttatgtcct

20

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat

30

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggcaccaagc atgcacggag tacacaga

28